

Received: 16.02.2018
Accepted: 10.07.2018
Published: 19.09.2018

Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej w inżynierii tkankowej i terapii trudno gojących się ran*

Adipose-derived stem cells for tissue engineering and therapy of non-healing wounds

Adriana Schumacher^{1,2}, Mirosława Cichorek¹, Michał Pikuła^{3,4}

¹Zakład Embriologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

²Katedra i Zakład Farmakologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

³Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

⁴Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej, Zakład Embriologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Rany przewlekłe są dziś ogromnym problemem medycznym, społecznym i ekonomicznym. Szczególnie dotyczy to starszych pacjentów bądź osób obciążonych chorobami nowotworowymi, metabolicznymi i autoimmunologicznymi. We współczesnej medycynie regeneracyjnej trwają usilne poszukiwania metod, które przyspieszałyby gojenie ran przewlekłych (stopy cukrzycowe, owrzodzenia, oparzenia).

W inżynierii tkankowej poszukiwania nowych rozwiązań stymulujących procesy gojenia ran opierają się na terapiach komórkowych, które są często wspierane czynnikami wzrostu i różnego rodzaju rusztowaniami. W ten sposób są tworzone substytuty skóry złożone z auto- lub alogenicznych komórek (macierzystych lub zróżnicowanych) oraz biodegradowalnych rusztowań mających na celu wypełnienie ubytku tkanki oraz stymulację gojenia ran.

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat właściwości biologicznych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (adipose-derived stem cells, ASCs), metod ich izolacji oraz możliwości wykorzystania w terapii ran przewlekłych. Tkanka tłuszczowa wydaje się bogatym źródłem komórek macierzystych o wielorakiej przydatności terapeutycznej na różnych etapach naprawy przewlekłe uszkodzonych tkanek. Ponadto, zwrócono szczególną uwagę na wydzielane przez ASCs cytokiny, czynniki wzrostu oraz egzosomy, które jak się uważa, mają decydujące znaczenie dla obserwowanych skutków klinicznych. W pracy opisano także podjęte badania kliniczne z wykorzystaniem ASCs.

W leczeniu trudno gojących się ran z zastosowaniem terapii komórkowych coraz częściej ocenia się bezpieczeństwo, powtarzalność i jakość pozyskiwanych komórek macierzystych. Zanim komórki ASCs znajdą szerokie i powszechne zastosowanie w terapiach klinicznych, wiele zagadnień z ich biologii musi jeszcze być poznanych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste tkanki tłuszczowej • trudno gojące się rany • inżynieria tkankowa

*Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju STRATEGMED1/235077/9/NCBR/2014.

Summary

Chronic wounds seem to be a big problem for the medicinal, social and commercial area, especially for elder patients or people with cancer, metabolic or autoimmune diseases. In this respect, in the modern regenerative medicine there are intensive studies on methodologies that stimulate healing of chronic wounds (diabetic foots, ulcers, burns).

In tissue engineering new solutions in wound healing are based on cellular therapies which consisting of growth factors and various types of scaffolds. In this way, there are created skin substitutes which are composed of cellular auto/allografts (stem cells and differentiated cells) and most commonly biodegradable scaffolds; they aim is not only to fill the tissue but also to stimulate wound healing.

In this article we demonstrate the current knowledge about biological properties of Adipose-derived Stem Cells (ASCs), methods of their isolation and potential for use in therapies for non-healing wounds. Adipose tissue seems to be an attractive and abundant stem cells source with therapeutic applicability in diverse phase of the repair and regeneration of the chronically damaged tissues. Additionally, it is believed that secreted by ASCs growth factors, cytokines and exosomes are decisive in the clinical effects. In this review, we also present the current clinical trials using stem cells derived from adipose tissue.

Increasingly, the use of cell therapy in wound healing treatment draws attention to the safety, reproducibility and quality of stem cells. Researches go on and therapy approaches are possible but the detailed knowledge of the ASCs biology must be thoroughly investigated before these cells would be widely used in the clinical trials.

Keywords: adipose-derived stem cells • non-healing wounds • tissue engineering

GICID 01.3001.0012.4927
DOI: 10.5604/01.3001.0012.4927
Word count: 7562
Tables: 3
Figures: 3
References: 120

Adres autorki: mgr Adriana Schumacher, Zakład Embriologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; Katedra i Zakład Farmakologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny, Dębowa 23, 80-204 Gdańsk; e-mail: aschumacher@gumed.edu.pl

Wykaz skrótów: **ASCs** – komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (adipose-derived stem cells); **BMSCs** – komórki macierzyste szpiku kostnego (bone marrow stem cells); **BMI** – wskaźnik masy ciała (body mass index); **DFU** – zespół stopy cukrzycowej (diabetic foot ulcers); **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix); **EMA/CAT** – European Medicines Agency/Committee for Advanced Therapies; **ESCs** – embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells); **HIF-1** – czynnik indukowany przez hipoksję; **iPSCs** – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells); **PBMC** – mononuklearne komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cell); **PRP** – osocze bogato-płytkowe (platelet rich plasma); **SCs** – komórki macierzyste (stem cells); **SSCs** – somatyczne komórki macierzyste (somatic stem cells); **SVF** – frakcja macierzy tkanki tłuszczowej/frakcja stromalna (stromal vascular fraction).

WSTĘP

Od wielu lat zwraca się uwagę na problem trudno gojących się ran, które pojawiają się w ciągu całego życia wśród 1-2% populacji ludzi w krajach rozwijających się [45]. Oddziaływanie środowiska zewnętrznego powoduje, że ochronna funkcja skóry oraz jej zdolności regeneracyjne wydają się krytyczne w obronie całego organizmu. Odpowiedzią na wszelkiego rodzaju uszkodzenia integralności skóry jest indukcja procesu gojenia, na który składają się powiązane ze sobą procesy: reakcja zapalna, proliferacja komórek, odbudowa struktury. Gdy dochodzi do zaburzeń wymienionych procesów, czas naprawy znacznie się wydłuża i powstają trudno gojące się/przewlekłe rany, które po 21 dniach nie wykazują cech gojenia [37, 89, 91, 97, 101]. Na przebieg procesu gojenia wpływają również m.in. rodzaj urazu, stan rany (obecność infekcji, martwicy, wysięku, obrzęku śródtkankowego w ranie oraz chroniczne urazy), stan zdrowia (m.in. niedożywienie, ogólne osłabienie, towarzyszące choroby układowe, metaboliczne, nowotworowe), uwarunkowania genetyczne, styl życia pacjenta (m.in. otyłość, niedobór witaminy C) [48, 91].

U osób powyżej 60. roku życia występowanie ran przewlekłych wzrasta i dotyczy około 3% populacji w krajach uprzemysłowionych [49]. Wzrostowi odsetka osób z ranami przewlekłymi sprzyja zwiększająca się zachorowalność na cukrzycę, otyłość, nowotwory, schorzenia naczyniowe, choroby autoimmunologiczne [9, 51]. Dotyczy to szczególnie pacjentów po radioterapii i chemioterapii oraz u zdiagnozowanych z odleżynami, zespołem stopy cukrzycowej (diabetic foot ulcers, DFU); czy owrzodzeniem żylnym. U prawie 10% pacjentów z cukrzycą diagnozuje się DFU [79], natomiast przewlekłe owrzodzenie podudzi dotyczy 1-4% Europejczyków [48]. Zaaansowana postać DFU wymaga stałej wielospecjalistycznej hospitalizacji. Występowanie trudno gojących się ran w przebiegu wielu chorób opóźnia leczenie i wydłuża terapię, a to zwiększa koszty opieki zdrowotnej [35]. Jedną z przyczyn występowania owrzodzenia stóp i rozwinięcia DFU są zaburzenia proliferacji i migracji komórek w miejscu gojenia [79] oraz wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix, ECM) [1]. W owrzodzeniach żylnych i odleżynach problem dotyczy głównie ukrwienia tkanki oraz upośledzonego wytwarzania czynników wzrostu. Procesy te ograniczają odbudowę naskórka i ziarninowanie [84, 88]. Istnieje zatem ciągła potrzeba poszukiwania nowych metod leczenia trudno gojących się ran. W poszukiwaniu od kilku lat wpisują się badania nad możliwościami regeneracyjnymi komórek macierzystych pozyskiwanych z różnych źródeł, w tym z tkanki tłuszczowej.

SUBSTYTUTY SKÓRY

Obecnie w chirurgii są wykorzystywane różne techniki leczenia ran m.in.: hydrochirurgię (oczyszczanie za pomocą wysokociśnieniowego strumienia roztworu NaCl), miejscową terapię podciśnieniową (MTP),

przeszczepu skóry czy też terapię z wykorzystaniem larw much *Phaenicia sericata*. W poważnych uszkodzeniach, wstępne oczyszczanie rany jest niewystarczające i wymagana jest również odbudowa ubytku tkanek [91]. W związku z tym inżynieria tkankowa koncentruje się na projektowaniu i wykorzystaniu funkcjonalnego odpowiednika skóry tzw. substytutu skóry, który składa się z biotechnologicznego opatrunku (rusztowania, scaffoldu) oraz komórek [19]. Rusztowaniem komórek mogą być żełe kolagenowe czy hydrożele (zaprojektowane na bazie naturalnych, syntetycznych bądź naturalno-syntetycznych materiałów) wzbogacone o różne czynniki wzrostu czy antybiotyki. Przykładem takich rusztowań są polimery hydrofilowe kwasu hialuronowego, alginianów czy siarczanów chondroityny [70]. Materiałem komórkowym w substytutach skóry są głównie keratynocyty lub fibroblasty pochodzące od pacjenta (auto-przeszczep) lub innej osoby (aloprzeszczep) [19]. Uważa się, że hodowane *in vitro* i przeszczepiane keratynocyty w żelu fibrynowym są bezpiecznym źródłem komórek do leczenia ran przewlekłych [59]. W ostatnich latach podejmowane są próby zastosowania również komórek macierzystych (stem cells, SCs), w tym pochodzących z tkanki tłuszczowej żółtej (adipose-derived stem cells, ASCs) [117]. Hodowane w żelu komórki umożliwiają uzupełnienie ubytku w miejscu uszkodzenia, a także wydzielając aktywne biologiczne czynniki wpływają na komórki biorące udział w gojeniu się rany [33, 114].

Wykorzystanie do produkcji żeli nowych technologii, takich jak: elektroprzędzenie (otrzymywanie nanowłókien z zastosowaniem wysokiego napięcia), separacja faz, samoorganizowanie do struktur włóknistych, umożliwiło zaprojektowanie rusztowań architektonicznie zbliżonych do naturalnie występującej macierzy zewnątrzkomórkowej [110]. Zwłaszcza hydrożele peptydowe, czyli projektowane peptydy zawierające naprzemiennie aminokwasy hydrofobowe i hydrofilowe, są istotną propozycją, ponieważ przez samoorganizację mogą tworzyć usieciowane kowalencyjne i niekowalencyjne wiązania chemiczne oraz są zdolne do spontanicznego organizowania się w nanofibryłę o średnicy około 10 nanometrów [43, 116]. Taka struktura rusztowania przypomina organizację białek tworzących macierz zewnątrzkomórkową, umożliwiając hodowlę komórek w trójwymiarowym rusztowaniu (hodowla 3D) [41, 116]. W systemie 3D komórki przylegają całą powierzchnią do elementów rusztowania, dzięki czemu struktura wpływa na istotne różnice w ich morfologii w porównaniu z hodowlą w systemie 2D [104]. Rozwój biomateriałów umożliwił powstanie nowych metod wytwarzania trójwymiarowych rusztowań do hodowli komórek, takich jak: bioprinting (tworzenie trójwymiarowego druku za pomocą biologicznych materiałów), patterning (modelowanie struktur biologicznych za pomocą odwzorowania), organ-on-a-chip (projektowanie modeli tkankowych za pomocą mikroukładów) [110].

Wykorzystywanie ASCs w badaniach trójwymiarowych, żelowych rusztowań dostarcza wielu istotnych infor-

macji o ich biologii, zwłaszcza o ich możliwościach różnicowania się w inne komórki. Wydaje się, że warunki decydujące o ich przyleganiu (adhezji) do rusztowania w istotny sposób wpływają na ten proces. Adhezja komórek wpływa na ich przeżycie, proliferację, migrację, oddziaływania międzykomórkowe [28]. Ponadto dzięki kontrolowanym właściwościom fizyko-chemicznym żeli oraz metodom ich wytwarzania (biofabrykacji), wiele biomateriałów indukuje różnicowanie *in vitro* komórek ASCs w kierunku adipocytów, osteocytów, chondrocytów, miocytów oraz komórek śródbłonna [22].

Kolagenowe żele wspomagają proliferację komórek przez oddziaływanie z integrynami występującymi w błonie komórkowej. ASCs mają silną ekspresję różnych podtypów integryn rozpoznających sekwencję RGD (sekwencja trzech aminokwasów: argininy, glicyny, kwasu asparaginowego) obecną w białkach macierzy międzykomórkowej np. witronektynie, fibronektynie, fibrynogenu, osteopontynie [78]. Badania fibroblastów oraz innych komórek hodowanych w siatkach kolagenowych wykazały także, że komórki przebudowują włókna kolagenu, przypominające organizację macierzy kolagenu podczas gojenia skóry [64].

W hodowli 3D ASCs wykorzystuje się także Matrigel (komercyjnie dostępną żelową matrycę membranową złożoną z białek wydzielanych przez komórki mysiego mięsaka), matrycę kolagenową typu I, mieszaninę kolagenu i chitozanu oraz gąbki kolagenowe [104]. Naturalne biomateriały są preferowane ze względu na zgodność tkankową (biokompatybilność) oraz na biodegradację. Obiecującymi modelami na konstrukty dla ASCs wydają się również syntetyczne polimery kwasu mlekowo-glikolowego (PLGA) [3, 87]. Rany leczone żelami fibryny i glikolu polietylenowego (PEG) zawierającymi ASCs wykazały wcześniejsze odkładanie się kolagenu, przebudowę rany oraz zwiększenie liczby naczyń w ranie [115]. Obecnie dostępne w lecznictwie są zarówno preparaty komórkowe np. Epicel™ (keratynocyty, Genzyme Tissue Repair Corporation, Cambridge, MA, USA), Dermograft™ (fibroblasty, Advanced Tissue Sciences, Inc, La Jolla, CA, USA), jak i bezkomórkowe substytuty skóry np. Integra™ (bydłęcy kolagen i siarczan chondroityny-6; Life Science Corporation, Plainsboro, NJ, USA) [19]. Według Meruane i wsp. wzbogacenie komercyjnie dostępnego bezkomórkowego substytutu skóry Integra™ w autologiczne ASCs poprawia regenerację skóry przez zwiększenie tworzenia naczyń i syntezy kolagenu [74].

Podejmowane są próby wzbogacania bezkomórkowych substytutów skóry w krótkie funkcjonalne peptydy lub inne elementy np. dendrymery, liposomy, nanocząsteczki srebra, złota, miedzi, węgla, które oddziałują na komórki w okolicy rany [57]. Na przykład zdolności ASCs (migracja, proliferacja i wydzielanie angiogennych czynników wzrostu) mogą być zwiększone w środowisku opartym o hydrożelowy peptyd RADA16-I (AcN-RADA-RADARADARADA-CONH₂) wzbogacony krótkimi funkcjonalnymi peptydami np. SKPPGTSS (zwiększa migrację

komórek macierzystych szpiku), FHRIKA (wiąże heparynę), PRGDSGYRGDS (zwiększa adhezję komórkową) [69].

POZYSKIWANIE ASCS

W medycynie regeneracyjnej dużym ograniczeniem jest pozyskanie odpowiednio dużej liczby komórek do terapii [67]. W czasie gojenia obecność komórek prekursorowych oraz licznych wytwarzanych przez nie czynników wzrostu zwiększa liczbę pozostałych komórek oraz proces ich migracji do miejsca gojenia [12]. Komórki macierzyste wykazują dużą zdolność do podziałów i potencjał do różnicowania w kierunku dojrzałych komórek. SCs ze względu na pochodzenie dzieli się na embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells, ESCs) oraz na somatyczne komórki macierzyste (somatic stem cells, SSCs) [104].

Pochodzenie somatycznych komórek macierzystych obejmuje: naskórek, szpik kostny, tkankę tłuszczową, okolicę mieszków włosowych, śródbłonek. Spośród wymienionych, tkanka tłuszczowa budzi szczególne zainteresowanie ze względu na dostępność oraz możliwość otrzymania dużej liczby komórek ASCs. Ponadto, pozyskiwanie ASCs ma mniej ograniczeń bioetycznych w porównaniu do komórek embrionalnych oraz mniejsze koszty w porównaniu do indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (induced pluripotent stem cells, iPSCs) [6, 38, 50].

Po raz pierwszy wyizolowali komórki ASCs z tkanki tłuszczowej Rodbell i Jones w latach sześćdziesiątych ub.w. [94, 95, 96]. Zainteresowanie ASCs wzrastało wraz z rozwojem technik usuwania tkanki tłuszczowej (liposukcji) oraz opracowaniem metody ich namnażania i różnicowania w inne komórki [119]. Pobieranie materiału klinicznego z tkanki tłuszczowej prostymi procedurami w znieczuleniu miejscowym jest mniej bolesne oraz zapewnia większy komfort pacjentowi w porównaniu z pozyskiwaniem komórek macierzystych szpiku kostnego (bone marrow stem cells, BMSCs) [50].

Zabiegi liposukcji indukują silne rozdzielenie tkanki [47] i umożliwiają pobranie lipoaspiratu [112], który jest źródłem komórek macierzy tkanki tłuszczowej (stromal vascular fraction, SVF) [11]. Niejednorodna grupa komórek SVF poza mezenchymalnymi komórkami macierzystymi zawiera, preadipocyty, fibroblasty, pericyty, komórki hematopoetyczne, leukocyty, komórki tuczne oraz komórki mięśni gładkich i śródbłonna [14, 66]. Według niektórych autorów preadipocyty (komórki progenitorowe adipocytów), poza mezenchymalnym pochodzeniem, mogą się różnicować z komórek szpiku i fibroblastów [14, 20, 40]. Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla ASCs w zależności od metod liposukcji, tzn. z użyciem np. liposukcji z ultradźwiękami czy wyłącznie ręcznego zasysania i płukania. Jednak, po liposukcji połączonej z ultradźwiękami zaobserwowano

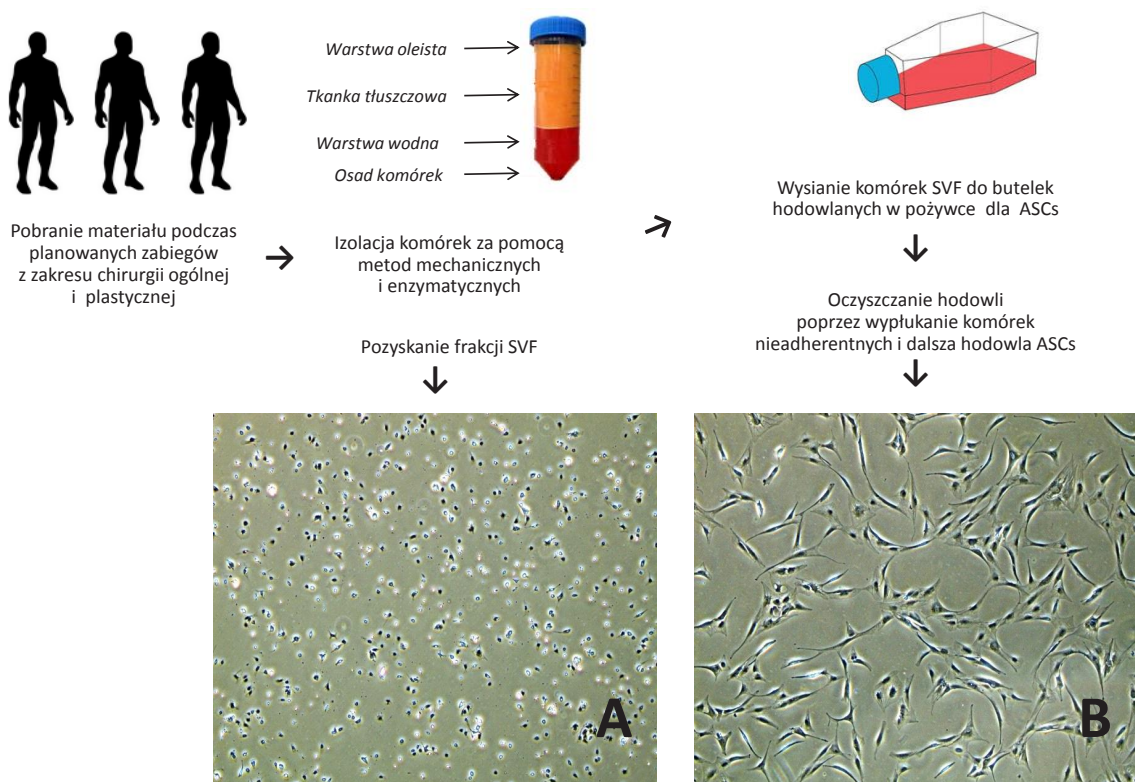
wzrost liczby komórek CD34⁺ oraz spadek ich żywotności i zdolności do proliferacji [8].

Do pozyskania komórek z tkanki tłuszczowej wykorzystuje się metody nieenzymatyczne i enzymatyczne [29]. Dostępne są aparaty do izolacji SVF, które coraz częściej są wykorzystywane w badaniach klinicznych i zabiegach w chirurgii plastycznej i rekonstrukcyjnej. Wykorzystują metody mechanicznej i enzymatycznej separacji komórek [83, 90]. W tej technice po mechanicznym rozdrobieniu materiału, poddawany jest działaniu enzymów (trypsyna, dyspaza czy kolageneza typu I i II) w temperaturze 37^o C 30-120 min. Ponadto, w procedurach zwraca się uwagę na parametry przygotowywania i neutralizowania enzymów, a także płukania/wirowania komórek [2, 10, 32, 58, 100]. Po izolacji komórki SVF umieszcza się w naczyniach hodowlanych, a kolejne wymiany pożywek oczyszczają hodowlę z nieadherentnych komórek pozostawiając adherentne ASCs (ryc. 1) [34]. Przed założeniem hodowli, zaleca się również liżę erytrocytów [2]. Wyselekcjonowane w czasie hodowli komórki są namnażane w mediach przeznaczonych do hodowli ASCs, a swoją macierzystość zachowują jeszcze długo (do 15 i więcej pasażów, w przybliżeniu około 15 tygodni) [38, 50].

CHARAKTERYSTYKA I BIOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI ASCS

W ostatniej dekadzie ogromne zainteresowanie ASCs dotyczy przede wszystkim ich właściwości biologicznych, które wspomagają regenerację kości, tkanki nerwowej, wysp trzustkowych, mięśnia sercowego. Podejmowane są próby ich wykorzystania w leczeniu chorych z udarami mózgu, chorobą Parkinsona, Alzheimera czy retinopatii [90]. ASCs wspomagają również regenerację skóry przez stymulację angiogenezy, właściwości parakryne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i immunomodulacyjne zapobiegają powstawaniu blizn przerostowych [6, 15]. Z tego też względu komórki te są wykorzystywane w procesie gojenia ran zarówno ostrych, jak i przewlekłych oraz pojawiających się podczas leczenia onkologicznego [6, 15, 24].

ASCs należą do komórek mezenchymalnych związanych z tkankami pochodzenia mezodermalnego. Komitet ds. Mezenchymalnych i Tkankowych Komórek Macierzystych Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej w 2006 r. przedstawił minimalne kryteria charakteryzujące ASCs. Należą do nich adherentny wzrost w standardowych warunkach hodowlanych;



Ryc. 1. Pozyskiwanie komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej. A - pierwotna hodowla ludzkich SVF. Heterogenna grupa komórek bezpośrednio po izolacji. B - wydłużone, przylegające do dna naczynia hodowlanego komórki ASCs po 96 h inkubacji. Zdjęcia wykonano z użyciem mikroskopu odwróconego Nikon DS-Fi1. Powiększenie 40x (opracowanie i badanie własne)

wysoka ekspresja (powyżej 95%) antygenów: CD73 (ekto-5-nucleotydaza), CD90 (Thy-1), CD105 (glikoproteina Endoglin) oraz bardzo niska ekspresja (poniżej 2%) antygenów komórek krwi i śródbłonna: CD14, CD34 (markery komórek hematopoetycznych) oraz CD11b, CD45 (marker leukocytów), CD79a i CD19 (markery powierzchniowe limfocytów B), HLA-DR, a także zdolność do różnicowania w warunkach *in vitro* w osteocyty, adipocyty i chondrocyty [7, 16, 25].

Jednym z największych problemów dotyczących ASCs jest brak zgodności co do charakterystyki ich immunofenotypu, na który składał by się ujednoczony zestaw markerów swoistych dla tych komórek. W tabeli 1 zebrano występujące w piśmiennictwie markery pozytywne i negatywne komórek ASCs [7, 18, 25, 63, 75, 86]. ASCs wykazują immunofenotyp podobny do mezenchymalnych komórek szpiku kostnego, z którymi dzielą następujące antygeny: CD29 (integryna β 1, receptor fibronektyny), CD49 z podjednostką c, CD147 (immunoglobulina BSG), CD166 (cząsteczka adhezji komórek aktywowanych limfocytami) oraz HLA-ABC (białka klasy I głównego układu zgodności tkankowej, MHC). Stwierdzono również wyraźne różnice w hodowlach ASCs między ekspresją CD10 (błonowa metaloendopeptydaza, neprilysin), CD45, CD34 i ze związanymi z nimi białkami, np. CD146 (MUC-18), CD106 (cząsteczka adhezji komórek śródbłonna), CD36 (receptory typu scavenger), CD49 z podjednostką f czy PODXL (podocalyxin-like protein 1) [63, 75, 86]. Do negatywnych markerów ASCs według niektórych autorów można zaliczyć także HLA-DR [55, 75, 76].

ASCs o odmiennym fenotypie mogą wykazywać zróżnicowane możliwości stymulacji gojenia się ran [82]. W związku z tym wydaje się, że sortowanie ASCs o określonym immunofenotypie będzie ważnym elementem w zwiększaniu przydatności klinicznej przeszczepianych komórek. Rozwój nowych technologii opartych na metodach cytofotometrii umożliwił już powstanie komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji komórek mezenchymalnych (np. BD Stemflow™; Human MSC Analysis Kit, PE Human, USA) i pluripotencjalnych (np. BD Stemflow™; Human Pluripotent Stem Cell Sorting and Analysis, Human Induced Pluripotent Stem Cell Analysis and Sorting Kit, USA).

Z dotychczasowych badań nad komórkami ASCs wynika, że ich biologiczne właściwości (zdolność do namnażania się, różnicowania w inne komórki) mogą zależeć od typu tkanki tłuszczowej (brunatna lub biała/żółta), anatomicznej lokalizacji, sposobu izolacji, warunków hodowli, a także cech osobniczych (wieku, płci) [7, 71].

Wykazano, że komórki te wydłużają swój cykl komórkowy w czasie długotrwałej hodowli [50, 71]. ASCs stymulują powstawanie naczyń krwionośnych przez wydzielanie proangiogennych czynników oraz hamują apoptozę komórek śródbłonna [93]. Zaobserwowano także, że zmniejszają indukowane przez chemioterapeutyki obumieranie tkanek, dzięki hamowaniu apoptozy komórek [103, 112].

ASCs jako komórki macierzyste wykazują potencjał do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych (adipogeneza), kostnych (osteogeneza), chrzęstnych (chondrogeneseza), mięśniowych (miogeneza, kardiomiogeneza), hepatocytów (hepatogeneza), komórek śródbłonna (angiogeneza) i tkanki nerwowej (neurogeneza) [17, 81, 93, 105, 106, 109]. Proces różnicowania *in vitro* ASCs zachodzi w czasie długotrwałej hodowli komórek w mediach wzbogaconych o różne czynniki stymulujące różnicowanie. ASCs ukierunkowywane na chondroblasty są hodowane w warunkach dużego zagęszczenia komórek, w pożywce zawierającej insulinę, askorbinian, deksametazon oraz transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β), natomiast różnicowanie do osteoblastów odbywa się w medium bogatym w β -glicerofosforan, deksametazon i witaminę D3. Zarówno w chondrogeniezie, jak i w osteogenezie hodowle typu 3D zwiększają odkładanie składników ECM. W czasie różnicowania chondroblastów intensywnie odkładana jest macierz zawierająca liczne glikozaminoglikany oraz kolagen, w tym przede wszystkim kolagen typu II. Podczas osteogenezy zachodzi mineralizacja ECM (odkładanie wapnia, osteokalcyny) oraz wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej [50, 71]. Proces różnicowania ASCs w inne komórki ocenia się na podstawie obecności charakterystycznych markerów z użyciem cytometrii przepływowej, barwień immuno- lub histochemicznych (ryc. 2). W zróżnicowanych komórkach jest oceniana ekspresja genów oraz zdolność do sekrecji cytokin charakterystycznych dla danej, ukierunkowanej w hodowli zróżnicowanej populacji komórek [108, 113].

Zaobserwowano, że zdolność do różnicowania ASCs w inne komórki, szczególnie chondrocyty i osteocyty może zależeć od parametrów osobniczych, takich jak wiek, wartość wskaźnika masy ciała (body mass index, BMI) [18, 30, 68, 71] oraz od miejsca pochodzenia tkanki tłuszczowej, czyli jej anatomicznej lokalizacji [23, 99, 102]. Zatem, na podstawie zbieranych informacji o ASCs wydaje się, że nie jest to jednorodna grupa komórek, a ich zróżnicowanie zależy od wielu czynników.

CYTOKINY WYDZIELANE PRZEZ ASCS

W wielu pracach wykazano, iż nadsącza z hodowli ASCs wpływają na migrację i proliferację różnego rodzaju komórek (keratynocytów, fibroblastów, leukocytów, tabela 2), a zawarte w nich cytokiny aktywują m.in. makrofagi oraz poprawiają ziarninowanie i unaczynienie rany [26, 42].

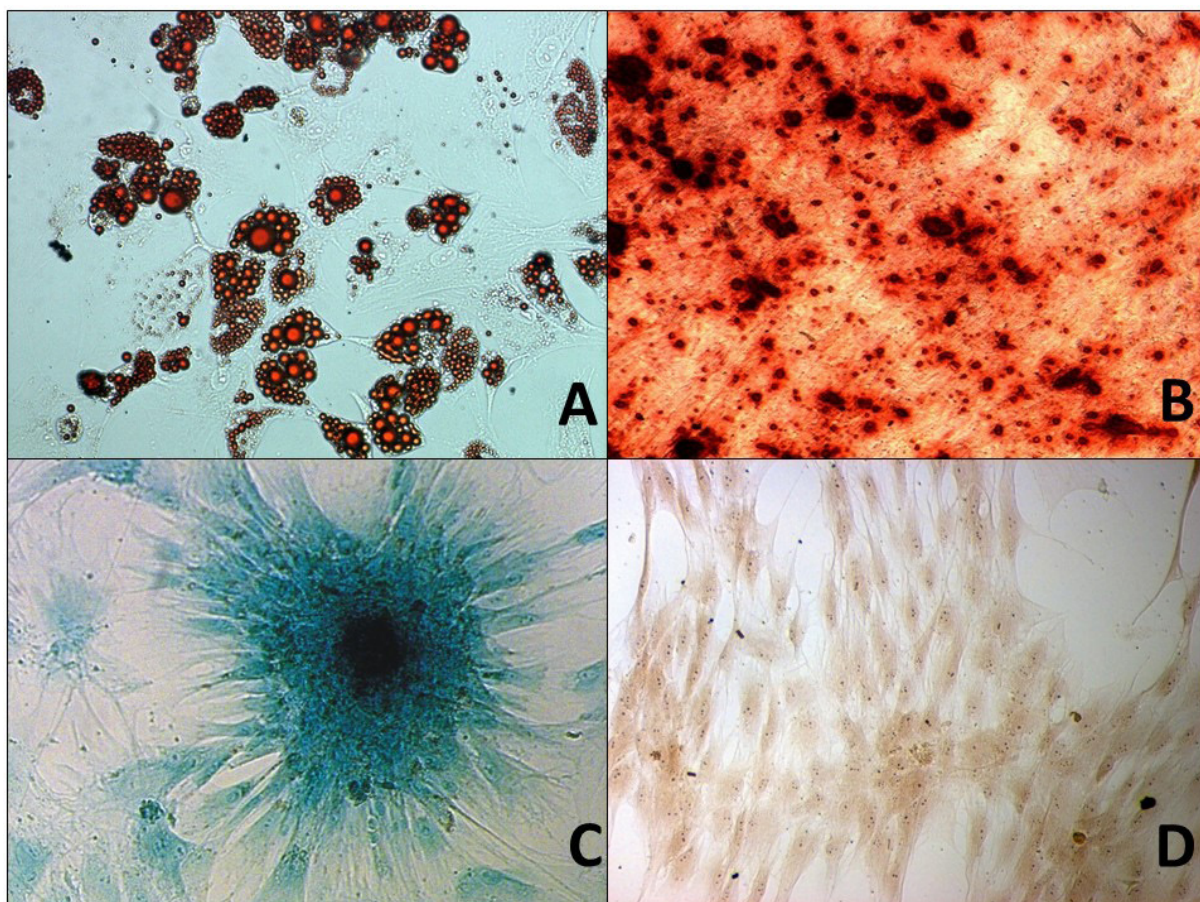
Pożywki z hodowli ASCs zawierają liczne cytokiny, takie jak: VEGF, HGF, TGF- β , KGF, bFGF, GM-CSF, które stymulują *in vitro* proliferację i migrację komórek śródbłonna, pierwotnych keratynocytów i fibroblastów [77, 118]. VEGF stymulując angiogenezę przyczynia się do tworzenia naczyń u pacjentów z niedokrwieniem i towarzyszącą zakrzepicą oraz u osób chorujących na cukrzycę [61, 62]. W czasie gojenia pod wpływem działania ASCs, stwierdza się tworzenie nowych naczyń i napływ BMSCs,

Tabela 1. Zestawienie pozytywnych i negatywnych markerów ASCs określających ich fenotyp na podstawie piśmiennictwa (opracowanie własne wg 7, 16, 25, 63, 75, 86)

Markery pozytywne ASCs	Markery negatywne ASCs
CD 9 (białko z rodziny tetraspanin) CD10 (MME, neprilysin) CD 11a (integryna alfa 1, antygen limfocytów LFA-1) CD 13 (ANPEP, aminopeptydaza M) CD 15 (Lewis X, glikan) CD 26 (DPP4, dipeptydylopeptydaza IV) CD 29 (ITGB1, integryna-β1, receptor dla fibronektyny) CD 36 (receptor typu scavenger) CD 40 (marker komórek prezentujących antygeny, receptor dla rodziny TNF) CD 44 (cząsteczka adhezji komórkowej typu homing/receptor dla kwasu hialuronowego) CD 46 (białko regulatorowe układu dopełniacza) CD 47 (integrin associated protein, IAP, sygnał „do not eat me” dla makrofagów) CD 49b (ITGA2, integryna-α2) CD 49c (ITGA3, integryna-α3) CD 49d (ITGA4, integryna-α4) CD 49e (ITGA5, integryna α5, receptor fibronektyny) CD 51 (receptor fibronektyny, avβ3) CD 54 (ICAM1, cząsteczka adhezji międzykomórkowej) CD 55 (DAF, regulator układu dopełniacza) CD 58 (LFA-3, cząsteczka adhezji komórkowej na komórkach prezentujących antygeny) CD 59 (białko regulatorowe układu dopełniacza) CD 61 (integryna-α3) CD 65 (ligand dla selektyny CD62L) CD 71 (receptor transferyny) CD 73 (NT5E, ekto-5-nukleotydaza) CD 80 (marker komórek prezentujących antygeny) CD 81 (antygen TAPA-1, białko z rodziny tetraspanin) CD 86 (marker komórek prezentujących antygeny) CD 90 (THY1, antygen Thy-1) CD 95 (receptor dla FAS) CD 98 (transporter aminokwasów LAT1) CD 99 (glikoproteina MIC2, E2 antygeny) CD 105 (ENG, glikoproteina Endoglin) CD 138 (Syndecan-1) CD 140a (PDGFRA, receptor PDGF alfa) CD 140b (PDGFRB, receptor PDGF beta) CD 144 (VE kadheryna) CD 147 (basigin, cząsteczka adhezyjna) CD 164 (sialomucyna, cząsteczka adhezji komórkowej) CD 166 (ALCAM, cząsteczka adhezyjna) CD 200 (glikoproteina błonowa OX-2) CD 201 (receptor dla białka C układu dopełniacza) CD 271 (NGFR, receptor czynnika wzrostu nerwów) HLA-ABC (białka klasy I głównego układu zgodności tkankowej)	<p>Markery komórek śródbłonna</p> CD 31 (PECAM1, cząsteczka adhezji komórek śródbłonna) CD 106 (VCAM1, adhezyja komórek śródbłonna)

które indukują kaskadę wydzielania następujących czynników wzrostu stymulujących proliferację keratynocytów i fibroblastów [31, 61, 77, 85, 118]. Wykazano, że wspólna hodowla komórek ASCs i fibroblastów stymuluje fibroblasty do migracji, różnicowania i sekrecji kolagenu. W związku z tym metody stymulujące zwiększenie wydzielania cytokin przez ASCs mogą sprzyjać procesowi gojenia [53].

Do metod tych należy przede wszystkim stworzenie warunków niedotlenienia (hipoksji) [61] w hodowli *in vitro* ASCs, co powoduje zwiększenie sekrecji VEGF, HIF-1α i bFGF [16] oraz stymuluje proliferację komórek śródbłonna [93]. Medium z hodowli ASCs w warunkach hipoksji jest wykorzystywane w schorzeniach związanych z zapaleniem skóry [77, 118]. ASCs w warunkach niedotlenienia zachowują morfologię i zdolność do różnicowania w inne komórki [4, 13, 36, 107].



Ryc. 2. Ocena zdolności ASCs do różnicowania się *in vitro* w adipocyty (A), osteocyty (B), chondrocyty (C). Poszczególne typy zróżnicowanych komórek pochodzące z ASCs (po drugim pasażu) hodowano w mediach różnicujących przez 14 dni, a następnie identyfikowano na podstawie barwień histochemicznych: (A) ASCs hodowane w medium Gibco™ StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco by Life Technology, Grand Island, NY, USA) w kierunku adipocytów wybarwione krople tłuszczu czerwieńią oleistą; (B) ASCs hodowane w medium Gibco™ StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco by Life Technology, Grand Island, NY, USA) w kierunku osteocytów wybarwione złoży wapnia czerwieńią alizarynową; (C) ASCs hodowane w medium Gibco™ StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco by Life Technology, Grand Island, NY, USA) w kierunku chondrocytów w postaci zagęszczonych komórek (kultury mikromasowej) wybarwione glikozaminoglikany błękitem alcajarskim; (D) ASCs hodowane w medium podstawowym Gibco™ MesenPRO RS™ Medium (Gibco by Life Technology, Grand Island, NY, USA) bez swoistych czynników różnicujących. Zdjęcia wykonano z użyciem mikroskopu odwróconego Zeiss oraz Nikon DS.-Fi1. Powiększenie 200x (badania własne)

ASCs różnicując się zmieniają ekspresję wielu białek i właściwości sekrecyjne. Podczas różnych etapów adipogenezy *in vitro* komórki wytwarzają inne adipokiny, a to zmienia skład ECM. Ponad 50% zidentyfikowanych, podczas różnicowania ASCs w kierunku adipocytów, białek sekrecyjnych jest związanych z endokrynną, energetyczną i termoregulacyjną rolą tkanki tłuszczowej [80, 120].

Zaobserwowano, że regenerację może przyspieszyć wzrost sekrecji, takich czynników wzrostu jak: bFGF, IGF-1, PDGF-BB [27]. Dodane do żeli synergistycznie wzmacniają efekt stymulujący proliferację ASCs i powodują przyspieszenie regeneracji, co odgrywa ważną rolę we wczesnej fazie gojenia [27]. Spośród licznych czynników wzrostu szczególnie rodzina PDGF odgrywa ważną rolę w gojeniu, ponieważ przedstawiciele tej grupy np. dimer PDGF-D działa jako silny mitogen komórek

mezenchymalnych. Wykazano także, że PDGF-D stymuluje namnażanie, migrację komórek ASCs, a także sekrecję czynników wzrostu przez te komórki. [46]. Zatem PDGF-D może być wykorzystany jako środek pobudzający działanie parakryne przeszczepianych ASCs dla takich czynników jak: VEGF, FGF1, FGF5, LIF, INHBA, IL-11 i HBEGF [46].

Bardzo ważną cechą komórek ASCs jest ich immunomodulacyjny wpływ na komórki układu immunologicznego oraz brak/bardzo niska immunogenność, co ma ogromne znaczenie w ich zastosowaniu w trudno gojących się ranach [7, 21, 52, 73]. Frakcja komórek SVF z tkanki tłuszczowej wytwarza więcej cytokin (IL-6, -8, -12, eotaksyny i TGF-β) związanych z działaniami immunomodulującymi w porównaniu do BMSCs [73]. Wspólna hodowla (ko-kultura) jednorodzących komórek krwi

obwodowej (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) i ASCs hamuje różnicowanie komórek dendrytycznych oraz zwiększa stężenie przeciwzapalnych cytokin [21, 73]. Lipopolisacharyd stymuluje ASCs do wydzielania czynników wzrostu, takich jak Fit-3 ligand, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-7 [52]. Wpływ najważniejszych czynników wydzielanych przez ASCs na komórki zaangażowane w gojenie ran ilustruje ryc. 3.

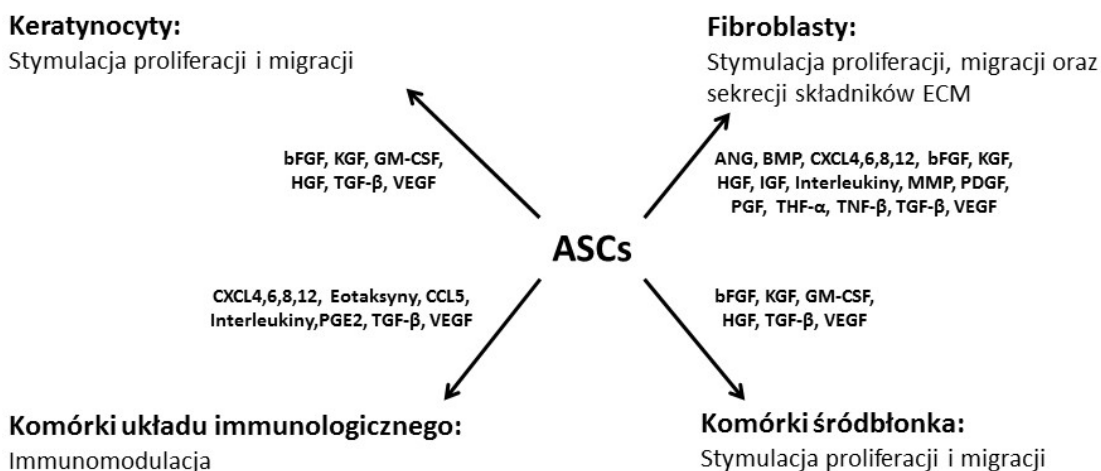
Mimo ogromnych możliwości wykorzystania ASCs w leczeniu trudno gojących się ran, istnieje potencjalne ryzyko ich spontanicznej transformacji nowotworowej. Długotrwała hodowla komórek SCs, w tym ASCs, zwiększa podatność na starzenie się i niestabilność genetyczną, co może spowodować zmiany w chromosomach [46, 56, 98]. Z tego względu tak duże zainteresowanie wzbudzają badania nad właściwościami mediów z hodowli ASCs, które są łatwo dostępne i bogatym źródłem licznych czynników wzrostu. Szczególną uwagę zwracają obecne w nich egzosomy, pęcherzyki o bogatym składzie, ponieważ przyczyniają się do zwiększenia działania parakrynnego ASCs [44]. Obecnie możliwe jest zastosowanie miniwyciskarek (mini-extruder) do zwiększenia wydzielania egzosomów w porównaniu do natu-

ralnych procesów sekrecyjnych komórki. Dzięki tym metodom możliwe jest przyspieszenie gojenia bez bezpośredniego aplikowania ASCs na uszkodzoną skórę [44, 54]. Nadsączka z hodowli ASCs mają mniejsze ograniczenia bezpieczeństwa w porównaniu z przeszczepianymi żywymi komórkami macierzystymi aplikowanymi bezpośrednio na ranę.

BADANIA KLINICZNE I BEZPIECZEŃSTWO TERAPII Z WYKORZYSTANIEM ASCS

ASCs są bardzo często wykorzystywanymi komórkami w terapii wielu chorób, głównie o podłożu zapalnym, chorób serca, uszkodzeń neurologicznych, rekonstrukcji tkanek miękkich, regeneracji chrząstek i kości. Podejmowane są także próby ich stosowania w leczeniu ran przewlekłych o różnej etiopatogenezie, włączając w to owrzodzenia powstałe z powodu chorób krążenia, przewlekłe rany powstające w przebiegu: cukrzycy typu 1, zaburzeń endokrynnych, stanów zapalnych, rozległych oparzeń (tabela 3) [6, 90].

ASCs, świeżo izolowane lub hodowane (pochodzenia alogenicznego lub autologicznego) są podawane na ranę



Udział komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w gojeniu ran:

1. Faza zapalenia

- Poprzez wydzielanie cytokin:
- zwiększając zawartość czynników wzrostu w ranie
 - modulują aktywność PBMC (immunomodulacja)

2. Faza proliferacji i migracji

- Poprzez stymulację proliferacji, migracji i sekrecji komórek wpływają na:
- odbudowę uszkodzonego naskórka (keratynocyty)
 - ziarninowanie rany (fibroblasty)
 - angiogenezę (komórki śródbłonna)

3. Faza dojrzewania

- Przebudowa struktury rany (metaloproteazy)

Ryc. 3. Udział ASCs w gojeniu ran (opracowanie własne wg 16, 21, 27, 52, 53, 54, 61, 65, 73, 77, 93, 107, 118, 120)

Tabela 2. Wybrane cytokiny wydzielane przez ASCs i ich właściwości biologiczne wobec komórek skóry, śródbłonna i układu immunologicznego (opracowanie własne wg 16, 21, 27, 52, 53, 54, 61, 65, 73, 77, 93, 107, 118, 120)

Cytokiny	Rola cytokin w badaniach <i>in vitro</i>	Piśmiennictwo
ANG-1,4	Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów	118
BMP-4,5,8	Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów	118
CXCL4,6,8,12	Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów; Zmiana sekrecji tych cytokin przez ASCs w warunkach hipoksji; Immunomodulacyjne działanie wobec PBMC	65, 73, 118, 120
Eotaksyny, CCL5	Immunomodulacyjne działanie wobec PBMC	73
bFGF, KGF	Zwiększenie proliferacji komórek śródbłonna; Stymulacja proliferacji i migracji keratynocytów i fibroblastów	16, 27, 53, 54, 65, 77, 93, 118
GM-CSF	Zwiększenie proliferacji komórek śródbłonna po pobudzeniu sekrecji tej cytokiny przez ASCs w warunkach hipoksji; Stymulacja proliferacji i migracji keratynocytów	77, 93
HGF	Zwiększenie proliferacji i migracji komórek śródbłonna; Stymulacja proliferacji i migracji keratynocytów i fibroblastów	16, 52, 53, 54, 65, 77, 93, 118
IGF	Zmiana sekrecji tej cytokiny przez ASCs w warunkach hipoksji; Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów	16, 27, 65, 118
IL-1 β , -6, -8, -11, -12	Immunomodulacyjne działanie wobec PBMC; Stymulacja proliferacji i migracji keratynocytów i fibroblastów	52, 74, 77, 118
MMP-1, -3, -7, -8, -9, -20	Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów	118
PDGF	Zmiana sekrecji tej cytokiny przez ASCs w warunkach hipoksji; Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów; Stymulacja proliferacji i migracji ASCs oraz ich właściwości sekrecyjnych	16, 27, 53, 54, 118
PGF	Stymulacja migracji fibroblastów	53
PGE2	Immunomodulacyjne działanie wobec limfocytów	21
TGF- β	Zwiększenie proliferacji komórek śródbłonna poprzez silne pobudzenie sekrecji tej cytokiny przez ASCs w warunkach hipoksji; Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów; Immunomodulacyjne działanie wobec PBMC	53, 73, 93, 118
TNF- α , TNF- β	Stymulacja proliferacji i migracji fibroblastów	52, 118
VEGF	Zwiększenie proliferacji komórek śródbłonna poprzez silne pobudzenie sekrecji tej cytokiny przez ASCs w warunkach hipoksji; Stymulacja proliferacji i migracji keratynocytów i fibroblastów; Immunomodulacyjne działanie wobec PBMC	16, 53, 61, 65, 73, 77, 93, 107, 118

ANG – angiopoetyna (angiopietin); BMP – białka morfogenetyczne kości (bone morphogenetic proteins); CXCL – rodzina chemokin o motywie C-X-C (C-X-C motif family chemokine); CCL – chemokina o motywie C-C z ligandem 5 (C-C motif chemokine ligand 5); bFGF – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor); KGF – czynnik wzrostu keratynocytów (keratinocyte growth factor); GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte macrophage-colony stimulating factor); HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); IL – interleukina (interleukin); MMP – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinase); PDGF – czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (platelet-derived growth factor); PGF – łożyskowy czynnik wzrostu (placenta growth factor); PGE – prostaglandyna E (prostaglandin E); TGF- β – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta); TNF – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor); VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor).

w postaci iniekcji bądź w żelu. W terapii tego typu wykorzystuje się parakrynnne działanie komórek ASCs związane z wytwarzaniem wielu czynników, w tym przede wszystkim VEGF, HGF, PDGF. W badaniach przedklinicznych i klinicznych udowodniono, że czynniki te stymulują zarówno keratynocyty, jak również fibroblasty i komórki śródbłonna do proliferacji i migracji [15, 26].

Wyniki prowadzonych dotąd badań klinicznych wskazują na bezpieczeństwo przeszczepiania komórek ASCs, jak również na ich stosunkowo dużą skuteczność w leczeniu ran przewlekłych [62, 84]. Badania te dotyczą przede wszystkim ran przewlekłych powstałych z powodu niedokrwienia [60, 72], a podanie komórek ASCs powodowało nie tylko szybsze gojenie rany, ale również zmniejszało dolegliwości bólowe. Podejmuje

Tabela 3. Wybrane badania kliniczne z wykorzystaniem ASCs w terapii trudno gojących się ran

Badanie	Oficjalna nazwa badania	Rodzaj badania	Faza	Liczba pacjentów	Piśmiennictwo
Odleżyny	„Evaluating the safety and feasibility of using autologous Adipose-derived stromal cells (ASCs) on adults with stage III or IV pressure ulcers”	Interwencyjny	I	12	NCT02375802
Defekty chrząstki stawowej	„A Comparative Clinical Trial for the Repair of Chondral Knee Defects: Transplantation of Autologous Cultured Chondrocytes vs. Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue”	Interwencyjny	I II	30	NCT01399749
Stopa cukrzycowa	„A Phase I Clinical Study to Evaluate the Safety of ALLO-ASC-DFU in the Patients With Diabetic Foot Ulcers”	Interwencyjny	I	5	NCT02394886
Oparzenia	„A Phase I Clinical Study to Evaluate the Safety of Allogeneic Adipose-derived Stem Cells in the Subjects With Deep Second-degree Burn Wound”	Interwencyjny	I	5	NCT02394873
Stopa cukrzycowa	„A Follow-up Study to Evaluate the Safety for the Patients With ALLO-ASC-DFU Treatment in Phase 1 Clinical Trial of ALLO-ASC-DFU-101”	Obserwacyjny	I	4	NCT03183726
Niedokrwienie kończyn dolnych	„A Randomized, Controlled, Parallel Group, Blinded, Feasibility Study of the TGI Adipose-derived Stromal Cell (ASC)-Coated ePTFE Vascular Graft for Femoral-tibial Bypass Grafting”	Interwencyjny	I II	60	NCT01305863
Rekonstrukcja piersi	„Breast Implant”	Obserwacyjny		57000	NCT00443274
Oparzenia	„A Follow-up Study to Evaluate the Safety for the Patients With ALLO-ASC-DFU Treatment in Phase 1 Clinical Trial of ALLO-ASC-BI-101”	Obserwacyjny	I	5	NCT03183622
Oparzenia	„A Follow-up Study to Evaluate the Safety for the Patients With ALLO-ASC-DFU Treatment in Phase 2 Clinical Trial of ALLO-ASC-BI-201”	Obserwacyjny	II	30	NCT03183648
Trudno gojące się rany	„A Phase I Open-labeled, Single-arm, Single-centred Study to Test the Safety of ADSC-SVF-002 in Subjects With Soft Tissue Defects or Abnormal Wound Healing”	Interwencyjny	I	10	NCT02590042
Oparzenia II i III stopnia	„Safety and Efficacy Evaluation of Tissue Engineered Construct Based on Allogeneic Adipose-derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Platelet-poor Plasma Fibrin Hydrogel to Treat the Patients With Burn Wounds”	Interwencyjny	I II	20	NCT03113747

Informacje opracowane na podstawie międzynarodowej bazy badań klinicznych (opracowanie własne wg ClinicalTrials.gov) (<http://clinicaltrials.gov> 22.11.2017).

się również próby podawania komórek ASCs z osoczem bogatopłytkowym (platelet-rich plasma, PRP). Rezultaty są obiecujące; u pacjentów, którzy byli poddani łączonej terapii szybciej zamykały się rany i zwiększało ukrwienie kończyny [92]. Wydaje się, iż podanie PRP z ASCs może działać synergistycznie powodując uwalnianie z płytek krwi czynników wzrostu, takich jak: PDGF-BB, TGF-β, VEGF i EGF [9].

Parametrami, które są oceniane w badaniach klinicznych to najczęściej: wielkość i głębokość rany (czas zerowy i 1,2,3,4 tygodnie), czas odtworzenia naskórka (1,2,4 tygodnie) oraz ocena tworzenia blizny („Vancouver Scar Scale”) [[https://clinicaltrials.gov/\(22.11.2017\)](https://clinicaltrials.gov/(22.11.2017))].

Warto jednak podkreślić, że w większości prowadzonych badaniach klinicznych z użyciem ASCs wykluczani są

pacjenci obciążeni dodatkowymi chorobami (np. AIDS) lub powikłaniami cukrzycowymi. Stąd niełatwa w ocenie wydaje się rzeczywista skuteczność terapii ASCs w trudniejszych przypadkach klinicznych.

Należy również dodać, iż wciąż istnieją obawy związane z ryzykiem kancerogenezy przez przeszczepiane ASCs. Wynika to z potencjalnego działania biologicznego tych komórek, które mogą stymulować proliferację innych komórek, indukować neoangiogenezę oraz tworzyć lokalną immunosupresję [90, 111]. Stąd w wielu badaniach klinicznych wyłączani są pacjenci onkologiczni. Poza tym różne sposoby izolacji i warunki hodowli ASCs *in vitro* sprawiają, że jest to materiał biologicznie zróżnicowany. Według EMA/CAT (European Medicines Agency/Committee for Advanced Therapies) działania *in vitro* mogą zmieniać właściwości komórek ASCs i nieść ryzyko działań niepożądanych, dlatego komórki ASCs są traktowane jako „produkty lecznicze do zaawansowanej terapii” i podlegają restrykcyjnym zasadom stosowania u ludzi (Regulation (EC) No 1394/2007) [5]. Jednak, jak dotąd nie ma dowodów na to, że terapia z użyciem ASCs niesie ryzyko nowotworzenia lub innych ciężkich działań niepożądanych. Z pewnością konieczne są wieloletnie, dokładne obserwacje kliniczne potwierdzające bezpieczeństwo i skuteczność terapeutyczną ASCs, jak również wyjaśniające mechanizm działania tych komórek.

PODSUMOWANIE

Trudno gojące się rany to bardzo ważny problem współczesnej opieki zdrowotnej. Nie tylko ciągle rosnąca

liczba osób w wieku podeszłym, ale również zwiększenie zachorowalności na choroby cywilizacyjne powoduje, że wzrasta liczba chorych ze zdiagnozowaną przewlekłą raną. Mimo ciągłego postępu w leczeniu poważnych uszkodzeń, przez wykorzystywanie różnego rodzaju opatrunków czy substytutów skóry, skuteczność stosowanych metod jest niewystarczająca. Jednym z obiecujących rozwiązań w ciężkich przypadkach ran chronicznych wydaje się wykorzystanie komórek macierzystych tkanki tłuszczowej – ASCs. W przeciwieństwie do ludzkich komórek macierzystych szpiku kostnego, można je pozyskiwać w większej liczbie. Poza tym ich zdolność do różnicowania w inne komórki (osteocyty, chondrocyty) umożliwia ich wykorzystanie w regeneracji tkanek i narządów. Ogromne znaczenie mają również zdolności sekrecyjne tych komórek, co sprawia, że nadająca znad hodowli ASCs są źródłem licznych czynników wzrostu wspomagających proces gojenia.

Bezpieczeństwo, jakość komórek (standaryzacja metod izolacji i hodowli, określenie fizjologicznego fenotypu), jak również restrykcyjne regulacje prawne wydają się dzisiaj największymi wyzwaniem przed szerokim zastosowaniem ASCs w rutynowej terapii. Jednak komórki ASCs mają ogromny potencjał kliniczny, dzięki któremu mogą się stać podstawą współczesnej inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej.

PIŚMIENICTWO

- [1] AbouIssa A., Mari W., Simman R.: Clinical usage of an extracellular, collagen-rich matrix: a case series. *Wounds*, 2015; 27: 313-318
- [2] Al Battah F., De Kock J., Ramboer E., Heymans A., Vanhaecke T., Rogiers V., Snykers S.: Evaluation of the multipotent character of human adipose tissue-derived stem cells isolated by Ficoll gradient centrifugation and red blood cell lysis treatment. *Toxicol. In Vitro*, 2011; 25: 1224-1230
- [3] Altman A.M., Gupta V., Rios C.N., Alt E.U., Mathur A.B.: Adhesion, migration and mechanics of human adipose-tissue-derived stem cells on silk fibroin-chitosan matrix. *Acta Biomater.*, 2010; 6: 1388-1397
- [4] Amos P.J., Bailey A.M., Shang H., Katz A.J., Lawrence M.B., Peirce S.M.: Functional binding of human adipose-derived stromal cells: effects of extraction method and hypoxia pretreatment. *Ann. Plast. Surg.*, 2008; 60: 437-444
- [5] Antunes M., Pottering H.: Regulation (EC) No 1394/2007 of The European Parliament and of The Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *J. European Union L.*, 2007; 324: 121-137
- [6] Atala A., Lanza R., Thomson J.A., Nerem R.: Principles of regenerative medicine. 2nd Edition. Academic Press 2010
- [7] Baer P.C.: Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J. Stem Cells*, 2014; 6: 256-265
- [8] Bajek A., Gurtowska N., Gackowska L., Kubiszewska I., Bodnar M., Marszałek A., Januszewski R., Michałkiewicz J., Drewa T.: Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human Adipose-Derived Stem Cells? *Biosci. Rep.*, 2015; 35: e00212
- [9] Blanton M.W., Hadad I., Johnstone B.H.: Adipose stromal cells and platelet-rich plasma synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2009; 123: 56S-64S
- [10] Boquest A.C., Shahdadfar A., Brinckmann J.E., Collas P.: Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods Mol. Biol.*, 2006; 325: 35-46
- [11] Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L., Redl H., Rubin J.P., Yoshimura K., Gimble J.M.: 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: 641-648
- [12] Brem H., Tomic-Canic M.: Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1219-1222
- [13] Buravkova L.B., Grinakovskaia O.S., Andreeva E.P., Zhambalova A.P., Kozyonova M.P.: Characteristics of human lipoaspirate isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. *Tsitologija*, 2009; 51: 5-11

- [14] Cawthorn W.P., Scheller E.L., MacDougald O.A.: Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.*, 2012; 53: 227-246
- [15] Cherubino M., Rubin J.P., Miljkovic N., Kelmendi-Doko A., Marra K.G.: Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann. Plast. Surg.*, 2011; 66: 210-215
- [16] Choi J.R., Pingguan-Murphy B., Wan Abas W.A., Noor Azmi M.A., Omar S.Z., Chua K.H., Wan Safwani W.K.: Hypoxia promotes growth and viability of human adipose-derived stem cells with increased growth factors secretion. *AEES*, 2014; 4: 328-338
- [17] Choi Y.S., Dusting G.J., Stubbs S., Arunothayaraj S., Han X.L., Collas P., Morrison W.A., Dilley R.J.: Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010; 14: 878-889
- [18] Choudhery M.S., Badowski M., Muise A., Pierce J., Harris D.T.: Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J. Transl. Med.*, 2014; 12:8
- [19] Cieřlik K., Witkowski W., Drukała J., Waligórska A., Puchala J.: Biotechnologiczne opatrunki i żywe substytuty skóry – przegląd i współczesne możliwości zastosowania. *Leczenie Ran*, 2005; 2: 71-83
- [20] Crossno J.T.Jr., Majka S.M., Grazia T., Gill R.G., Klemm D.J.: Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 3220-3228
- [21] Cui L., Yin S., Liu W., Li N., Zhang W., Cao Y.: Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng.*, 2007; 13: 1185-1195
- [22] Dai R., Wang Z., Samanipour R., Koo K.I., Kim K.: Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells Int.*, 2016; 2016: 6737345
- [23] De Girolamo L., Stanco D., Salvatori L., Coroniti G., Arrigoni E., Silecchia G., Russo M.A., Niada S., Petrangeli E., Brini A.T.: Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2013; 26: 11-21
- [24] Deptuła M., Zieliński J., Wardowska A., Pikuła M.: Wound healing complications in oncological patients: perspectives for cellular therapy. *Adv. Dermatol. Allergol.*, 2018 (in print)
- [25] Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8: 315-317
- [26] Ebrahimian T.G., Pouzoulet F., Squiban C., Buard V., André M., Cousin B., Gourmelon P., Benderitter M., Casteilla L., Tamarat R.: Cell therapy based on adipose tissue derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 2009; 29: 503-510
- [27] Farnebo S., Farnebo L., Kim M., Woon C., Pham H., Chang J.: Optimized repopulation of tendon hydrogel: synergistic effects of growth factor combinations and adipose-derived stem cells. *HAND*, 2017; 12: 68-77
- [28] Flynn L., Prestwich G.D., Semple J.L., Woodhouse K.A.: Adipose tissue engineering with naturally derived scaffolds and adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, 2007; 28: 3834-3842
- [29] Francis M.P., Sachs P.C., Elmore L.W., Holt S.E.: Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis*, 2010; 6: 11-14
- [30] Frazier T.P., Gimble J.M., Devay J.W., Tucker H.A., Chiu E.S., Rowan B.G.: Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells. *BMC Cell Biol.*, 2013; 14: 34
- [31] Galiano R.D., Tepper O.M., Pelo C.R., Bhatt K.A., Callaghan M., Bastidas N., Bunting S., Steinmetz H.G., Gurtner G.C.: Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am. J. Pathol.*, 2004; 164: 1935-1947
- [32] Garcia-Olmo D., Herreros D., Pascual M., Pascual I., De-La-Quintana P., Trebol J., Garcia-Arranz M.: Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2009; 24: 27-30
- [33] Gibbs S., van den Hoogenband H.M., Kirtschig G., Richters C.D., Spiekstra S.W., Breetveld M., Scheper R.J., de Boer E.M.: Autologous full-thickness skin substitute for healing chronic wounds. *Br. J. Dermatol.*, 2006; 155: 267-274
- [34] Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A.: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.*, 2007; 100: 1249-1260
- [35] Gottrup F., Apelqvist J., Price P.: Outcomes in controlled and comparative studies on non-healing wounds: recommendations to improve the quality of evidence in wound management. *J. Wound Care*, 2010; 19: 237-268
- [36] Grayson W.L., Zhao F., Bunnell B., Ma T.: Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 358: 948-953
- [37] Greaves N.S., Ashcroft K.J., Baguneid M., Bayat A.: Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.*, 2013; 72: 206-217
- [38] Harasymiak-Krzyżanowska I., Niedojadło A., Karwat J., Kotuła L., Gil-Kulik P., Sawiuk M., Kocki J.: Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2013; 18: 479-493
- [39] Harsha A., Stojadinovic O., Brem H., Sehara-Fujisawa A., Wewer U., Loomis C.A., Blobel C.P., Tomic-Canic M.: ADAM12: a potential target for the treatment of chronic wounds. *J. Mol. Med.*, 2008; 86: 961-969
- [40] Hausman G.J., Hausman D.B.: Search for the preadipocyte progenitor cell. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 3103-3106
- [41] Holmes T.C., De Lacalle S., Su X., Liu G., Rich A., Zhang S.: Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 6728-6733
- [42] Hong S.J., Jia S.X., Xie P., Xu W., Leung K.P., Mustoe T.A., Galiano R.D.: Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PLoS One*, 2013; 8: 55640
- [43] Hou Q., De Bank P.A., Shakesheff K.M.: Injectable scaffolds for tissue regeneration. *J. Mater. Chem.*, 2004; 14: 1915-1923
- [44] Hu L., Wang J., Zhou X., Xiong Z., Zhao J., Yu R., Huanq F., Zhang H., Chen L.: Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 32993
- [45] Hu M.S., Leavitt T., Malhotra S., Duscher D., Pollhammer M.S., Walmsley G.G., Maan Z.N., Cheung A.T., Schmidt M., Huemer G.M., Longaker M.T., Lorenz H.P.: Stem cell-based therapeutics to improve wound healing. *Plast. Surg. Int.*, 2015; 2015: 383581
- [46] Hye Kim J., Gyu Park S., Kim W.K., Song S.U., Sung J.H.: Functional regulation of adipose-derived stem cells by PDGF-D. *Stem Cells*, 2015; 33: 542-556
- [47] Illouz Y.G.: Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1983; 72: 591-597
- [48] Imko-Walczyk B., Okuniewska A., Pikuła M., Nowacka-Pikuła D., Czubek M., Jařkiewicz J., Trzonkowski P.: Możliwość klinicznego wykorzystania hodowli keratynocytów i komórek macierzystych naskórki w leczeniu przewlekłych owrzodzeń podudzi – doniesienie wstępne. *Przeřl. Dermatol.*, 2012; 99: 230-234

- [49] Jawień A., Bartoszewicz M., Przondo-Mordarska A., Szewczyk M.T., Kaszuba A., Urbanek T., Staszkiwicz W., Sopata M., Kucharzewski M., Korzon-Burakowska A., Krasowski G., Kózka M., Sikorski J., Junka A.: Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji. *Leczenie Ran*, 2012; 9: 59-75
- [50] Jezierska-Woźniak K., Nosarzewska D., Tutas A., Mikołajczyk A., Okliński M., Jurkowski M.K.: Use of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 326-332
- [51] Jung K., Covington S., Sen C.K., Janusz M., Kirsner R.S., Gurtner G.C., Shah N.H.: Rapid identification of slow healing wounds. *Wound Repair Regen.*, 2016; 24: 181-188
- [52] Kilroy G.E., Foster S.J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J.W., Stricker D.M., Potiny S., Green P., Halvorsen Y.D., Cheatham B., Storms R.W., Gimble J.M.: Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic and proinflammatory factors. *J. Cell Physiol.*, 2007; 212: 702-709
- [53] Kim W.S., Park B.S., Sung J.H., Yang J.M., Park S.B., Kwak S.J., Park J.S.: Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48: 15-24
- [54] Kim Y.S., Kim J.Y., Cho R., Shin D.M., Lee S.W., Oh Y.M.: Adipose stem cell-derived nanovesicles inhibit emphysema primarily via an FGF2-dependent pathway. *Exp. Mol. Med.*, 2017; 49: e284
- [55] Kobilak J., Dinnyes A., Memic A., Khademhosseini A., Mobarsheri A.: Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 2016; 99: 62-68
- [56] Kocan B., Maziarz A., Tabarkiewicz J., Ochiya T., Banaś-Ząbczyk A.: Trophic activity and phenotype of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a background of their regenerative potential. *Stem Cells Int.*, 2017; 2017: 1653254
- [57] Koutsopoulos S., Unsworth L.D., Nagai Y., Zhang S.: Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 4623-4628
- [58] Kurita M., Matsumoto D., Shigeura T., Sato K., Gonda K., Harii K., Yoshimura K.: Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2008; 121: 1033-1041
- [59] Langa P., Wardowska A., Zieliński J., Podolak-Popinigis J., Sass P., Sosnowski P., Kondej K., Renkielska A., Sachadyn P., Trzonkowski P., Piłka M.: Transcriptional profile of in vitro expanded human epidermal progenitor cells for the treatment of non-healing wounds. *J. Dermatol. Sci.*, 2018; 89: 272-281
- [60] Lawall H., Bramlage P., Amann B.: Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb. Haemost.*, 2010; 103: 696-709
- [61] Lee E.Y., Xia Y., Kim W.S., Kim M.H., Kim T.H., Kim K.J., Park B.S., Sunq J.H.: Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.*, 2009; 17: 540-547
- [62] Lee H.C., An S.G., Lee H.W., Park J.S., Cha K.S., Hong T.J., Park J.H., Lee S.Y., Kim S.P., Kim Y.D., Chunq S.W., Bae Y.C., Shin Y.B., Kim J.I., Jung J.S.: Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ. J.*, 2012; 76: 1750-1760
- [63] Lee R.H., Seo M.J., Pulin A.A., Gregory C.A., Ylostalo J., Prockop D.J.: The CD34-like protein PODXL and $\alpha 6$ -integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood*, 2009; 113: 816-826
- [64] Lee R.T., Berditchevski F., Cheng G.C., Hemler M.E.: Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1995; 76: 209-214
- [65] Lee S.H., Jin S.Y., Song J.S., Seo K.K., Cho K.H.: Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann. Dermatol.*, 2012; 24: 136-143
- [66] Liu J., Divoux A., Sun J., Zhang J., Clément K., Glickman J. N., Sukhova G.K., Wolters P.J., Du J., Gorgun C.Z., Doria A., Libby P., Blumberg R.S., Kahn B.B., Hotamisligil G.S., Shi G.P.: Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.*, 2009; 15: 940-945
- [67] Liu J.Y., Hafner J., Dragieva G., Seifert B., Burg G.: Autologous cultured keratinocytes on porcine gelatin microbeads effectively heal chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.*, 2004; 12: 148-156
- [68] Liu M., Lei H., Dong P., Fu X., Yang Z., Yang Y., Ma J., Liu X., Cao Y., Xiao R.: Adipose-derived mesenchymal stem cells from the elderly exhibit decreased migration and differentiation abilities with senescent properties. *Cell Transplant.*, 2017; 26: 1505-1519
- [69] Liu X., Wang X., Wang X., Ren H., He J., Qiao L., Cui F.Z.: Functionalized self-assembling peptide nanofiber hydrogels mimic stem cell niche to control human adipose stem cell behavior in vitro. *Acta Biomater.*, 2013; 9: 6798-6805
- [70] Madry H., Rey-Rico A., Venkatesan J.K., Johnstone B., Cucchiari M.: Transforming growth factor beta-releasing scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2014; 20: 106-125
- [71] Marędział M., Marycz K., Tomaszewski K.A., Kornicka K., Henry B.M.: The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.*, 2016; 2016: 2152435
- [72] Marino G., Moraci M., Armenia E., Orabona C., Sergio R., De Sena G., Capuozzo V., Barbarisi M., Rosso F., Giordano G., Iovino F., Barbarisi A.: Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease. *J. Surg. Res.*, 2013; 185: 36-44
- [73] Melief S.M., Zwaginga J.J., Fibbe W.E., Roelofs H.: Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl. Med.*, 2013; 2: 455-463
- [74] Meruane M.A., Rojas M., Marcelain K.: The use of adipose tissue-derived stem cells within a dermal substitute improves skin regeneration by increasing neoangiogenesis and collagen synthesis. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2012; 130: 53-63
- [75] Mildmay-White A., Khan W.: Cell surface markers on adipose-derived stem cells: a systematic review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2017; 12: 484-492
- [76] Mizuno H., Tobita M., Ogawa R., Orbay H., Fujimura J., Ono S., Kakudo N., Kusumoto K., Hyakusoku H.: Adipose-derived stem cells in regenerative medicine. W: Principles of Gender-Specific Medicine - 3rd Edition, red. M.J. Legato. Academic Press, 2017, 459-479
- [77] Moon K.M., Park Y.H., Lee J.S., Chae Y.B., Kim M.M., Kim D.S., Kim B.W., Nam S.W., Lee J.H.: The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012; 13: 1239-1257
- [78] Morandi E.M., Verstappen R., Zwierzina M.E., Geley S., Pierer G., Ploner C.: ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 28889
- [79] Mrozikiewicz-Rakowska B., Jawień A., Sopata M., Kucharzewski M., Szewczyk M.T., Kózka M., Korzon-Burakowska A., Rowiński O., Szopiński P., Oszkiniś G., Staniszc M., Masłowski L., Bartoszewicz M., Czupryniak L., Krzymień J.: Organizacja opieki nad chorymi z zespołem stopy cukrzycowej. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Leczenia Ran. *Leczenie Ran*, 2015; 12: 83-112
- [80] Murawska-Ciałowicz E.: Tkanka tłuszczowa - charakterystyka morfologiczna i biochemiczna różnych depozytów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2017; 71: 466-484

- [81] Nagata H., Li M., Kohbayashi E., Hoshiga M., Hanafusa T., Asahi M.: Cardiac adipose-derived stem cells exhibit high differentiation potential to cardiovascular cells in C57BL/6 mice. *Stem Cells Transl. Med.*, 2016; 5: 141-151
- [82] Nielsen F.M., Riis S.E., Andersen J.I., Lesage R., Fink T., Pennisi C.P., Zachar V.: Discrete adipose-derived stem cell subpopulations may display differential functionality after in vitro expansion despite convergence to a common phenotype distribution. *Stem Cell Res. Ther.*, 2016; 7: 177
- [83] Oberbauer E., Steffenhagen C., Wurzer C., Gabriel C., Redl H., Wolbank S.: Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen.*, 2015; 4: 7
- [84] Ozkaya H., Bahat G., Tufan A., Dogan H., Bilicen Z., Karan M.A.: Successful treatment of non-healing pressure ulcers with topical n-acetyl cysteine. *J. Wound Care*, 2015; 24: 606-611
- [85] Ozpur M.A., Guneren E., Canter H.I., Karaaltin M.V., Ovali E., Yogan F.N., Baygol E.G., Kaplan S.: Generation of skin tissue using adipose tissue-derived stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2016; 137: 134-143
- [86] Pachón-Peña G., Yu G., Tucker A., Wu X., Vendrell J., Bunnell B.A., Gimble J.M.: Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J. Cell. Physiol.*, 2011; 226: 843-851
- [87] Park J.G., Lee J.H., Kim J.N., Kang J.A., Kim K.J., Park K.D., Han D.K., Ahn S.T., Rhie J.W.: Chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells in functional PLGA scaffolds. *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2011; 8: 47-54
- [88] Pastar I., Khan A.A., Stojadinovic O., Lebrun E.A., Medina M.C., Brem H., Kirsner R.S., Jimenez J.J., Leslie C., Tomic-Canic M.: Induction of specific microRNAs inhibits cutaneous wound healing. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 29324-29335
- [89] Pikula M., Langa P., Kosikowska P., Trzonkowski P.: Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 874-885
- [90] Pikula M., Marek-Trzonkowska N., Wardowska A., Renkielska A., Trzonkowski P.: Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2013; 13: 1357-1370
- [91] Ples M.J., Glik J., Misiuga M., Skotnicka J., Kawecki M., Nowak M.: Rany przewlekłe i ich leczenie. Substytuty skóry i przeszczepy allogeniczne. *JOTSRR*, 2016; 1: 48-56
- [92] Raposio E., Bertozzi N., Bonomini S., Bernuzzi G., Formentini A., Grignaffini E., Pio Grieco M.: Adipose-derived stem cells added to platelet-rich plasma for chronic skin ulcer therapy. *Wounds*, 2016; 28: 126-131
- [93] Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Conside R.V., March K.L.: Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 2004; 109: 1292-1298
- [94] Rodbell M.: Metabolism of Isolated Fat Cells II. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* α toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1966; 241: 130-139
- [95] Rodbell M.: The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J. Biol. Chem.*, 1966; 241: 3909-3917
- [96] Rodbell M., Jones A.B.: Metabolism of Isolated Fat Cells III. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* α toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J. Biol. Chem.*, 1966; 241: 140-142
- [97] Roubelakis M.G., Trohatou O., Roubelakis A., Mili E., Kalaitzopoulos I., Papazoglou G., Pappa K.L., Anagnou N.P.: Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev.*, 2014; 10: 417-428
- [98] Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C., de la Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernard A.: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.*, 2005; 65: 3035-3039
- [99] Russo V., Yu C., Belliveau P., Hamilton A., Flynn L.E.: Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications. *Stem Cells Transl. Med.*, 2014; 3: 206-217
- [100] Sanz-Ruiz R., Fernández-Santos E., Domínguez-Muñoz M., Parma R., Villa A., Fernández L., Sánchez P.L., Fernández-Avilés F.: Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease. *Cell Transplant.*, 2009; 18: 245-254
- [101] Schreml S., Szeimies R.M., Prantl L., Landthaler M., Babilas P.: Wound healing in the 21st century. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010; 63: 866-881
- [102] Shah F.S., Li J., Dietrich M., Wu X., Hausmann M.G., LeBlanc K.A., Wade J.W., Gimble J.M.: Comparison of stromal/stem cells isolated from human omental and subcutaneous adipose depots: differentiation and immunophenotypic characterization. *Cells Tissues Organs*, 2014; 200: 204-211
- [103] Shih Y.C., Lee P.Y., Cheng H., Tsai C.H., Ma H., Tarng D.C.: Adipose-derived stem cells exhibit antioxidative and antiapoptotic properties to rescue ischemic acute kidney injury in rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2013; 132: 940e-951e
- [104] Słońska A., Cymerys J.: Zastosowanie trójwymiarowych hodowli komórek nerwowych w badaniach mechanizmów przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2017; 71: 510-519
- [105] Takahashi M., Suzuki E., Oba S., Nishimatsu H., Kimura K., Nagano T., Nagai R., Hirata Y.: Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010; 298: H415-H423
- [106] Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R., Mirabet V., Carbonell F., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J.: Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 5834-5845
- [107] Thangarajah H., Vial I.N., Chang E., El-Ftesi S., Janusz M., Chang E.L., Paterno J., Neofytou E., Longaker M.T., Gurtner G.C.: IFATS collection: adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells*, 2009; 27: 266-274
- [108] Tremp M., Salemi S., Gobet R., Sulser T., Eberli D.: Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) for Tissue Engineering. W: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, red.: D. Eberli. IntechOpen, 2011, 179-194
- [109] Vieira N.M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B.E., Zatz M.: Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.*, 2010; 19: 279-289
- [110] Wade R.J., Burdick J.A.: Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly. *Nano Today*, 2014; 9: 722-742
- [111] Yañez R., Lamana M.L., García-Castro J., Colmenero I., Ramirez 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
- [112] Yao W., Hu Q., Ma Y., Xiong W., Wu T., Cao J., Wu D.: Human adipose-derived mesenchymal stem cells repair cisplatin-induced acute kidney injury through antiapoptotic pathways. *Exp. Ther. Med.*, 2015; 10: 468-476
- [113] Yu J., Tu Y.K., Tang Y.B., Cheng N.C.: Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation. *Biomaterials*, 2014; 35: 3516-3526
- [114] Zahorec P., Koller J., Danisovic L., Bohac M.: Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. *Cell Tissue Bank*, 2015; 16: 19-26

-
- [115] Zamora D.O., Natesan S., Becerra S., Wrice N., Chung E., Suggs L.J., Christy R.J.: Enhanced wound vascularization using a dsASCs seeded FPEG scaffold. *Angiogenesis*, 2013; 16: 745-757
- [116] Zhang S.G.: Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.*, 2003; 21: 1171-1178
- [117] Zhang L., Xu P., Wang X., Zhang M., Yan Y., Chen Y., Zhang L., Zhang L.: Activin B regulates adipose-derived mesenchymal stem cells to promote skin wound healing via activation of the MAPK signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2017; 87: 69-76
- [118] Zhao J., Hu L., Liu J., Gong N., Chen L.: The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts *in vitro*. *Biomed Res. Int.*, 2013; 2013: 578479
- [119] 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
- [120] Zvonic S., Lefevre M., Kilroy G., Floyd Z.E., DeLany J.P., Kheterpal I., Gravois A., Dow R., White A., Wu X., Gimble J.M.: Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol. Cell Proteomics*, 2007; 6: 18-28
-

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.