مقاله پژوهشی

جداسازی و بررسی ویژگی‌های بافت چربی انسان جهت تهیه سلول‌های بنیادی عروقی

سونا زارع[۱]، محمدعلی نیلفروش زاده[۱]، رحیم احمدی[۲*] و زهرا اسمعیلی[۳]

۱- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۳- گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی، دکتری تخصصی بیولوژی جانوری، drrahahmadi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۳/۱۹

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: مطالعات متعددی در رابطه با ویژگی‌های زیستی بخش عروق استرومای مشتق از بافت چربی انسان (Human stromal vascular fraction (SVF) derived from adipose tissue) انجام گرفته است؛ هرچند، بررسی‌ها در خصوص تنوع جمعیت سلولی این بخش به دلیل کاربردهای بالینی آن هنوز هم دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. هدف از این تحقیق جداسازی و بررسی ویژگی‌های جمعیت سلولی بخش عروق استرومای بافت چربی انسان با هدف اصلی بررسی حضور سلول‌های بنیادی در فرکشن عروق استرومای بافت چربی انسان می‌باشد.

روش مطالعه: طی این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی بافت چربی از ۱۰ بیمار گرفته و در شرایط استاندارد نگهداری شد. سلول‌ها پس از جداسازی به روش آنزیمی از نظر میزان زنده‌مانی و همچنین آنتی‌ژن‌های سطحی با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که سلول‌های بخش عروق استرومای بافت چربی دارای ویژگی زنده مانی بالا (بیش از ۹۸ درصد) بوده و نسبت به مارکرهای CD16، CD34، CD73، CD29، CD105، CD31 و CD45 مثبت و نسبت به مارکرهای CD3، CD19 و CD38 منفی می‌باشند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشانگر حضور سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، سلول‌های اندوتلیالی، پری‌ادیپوسیت و ماکروفاژ در بخش عروقی استرومای مشتق از بافت چربی انسان بوده؛ بر این مبنا، این فرکشن دارای پتانسیل مناسبی در حوزه بالینی مربوط به سلول‌درمانی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بخش عروقی استروما، بافت چربی، جمعیت سلولی، CD مارکر

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های غیر تخصصی ارگانیسم در مراحل اولیه‌ی سیر تکاملی هستند که دارای ظرفیت تکثیری وسیعی هستند و می‌توانند در شرایط نرمال به انواع مختلف سلول‌های بالغ که از نظر عملکردی تخصصی هستند تمایز یابند. خصوصیات اصلی سلول‌های بنیادی، خودبازنوسازی، کلونوژنیسیته و پتانسیل است. خودبازنوسازی توانایی سلول برای تقسیم حداقل یک سلول از سلول‌های فراوان است که می‌تواند توانایی خودبازنوسازی و تمایز را حفظ کند. کلونوژنیسیته توانایی ایجاد کردن کلون یا سلول‌هایی با مواد ژنتیکی یکسان است، در حالی که پتانسیل سلول‌های بنیادی، توانایی تمایز به انواع مختلف سلول‌های تخصصی است (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et*

al., 2006; Hui *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2015; Raščanin *et al.*, 2019). معیارهایی برای مشخص کردن و شناسایی انواع سلول‌های بنیادی و دیگر انواع سلولی موجود در فرکشن‌های تهیه شده از بافت‌های انسانی تعریف شده‌اند. این معیارها این سلول‌ها را به دلیل توانایی تمایز به سلول‌های دیگر و بیان مجموعه‌ای از مارکرهای سطحی مشخص می‌کنند (Dominici *et al.*, 2006; Gimble *et al.*, 2013). سلول‌های بنیادی و دیگر سلول‌های موجود در فرکشن‌های تهیه شده از بافت‌های مختلف از جمله بافت چربی می‌توانند در مهندسی بافت و سلول‌درمانی و به طور کلی در تحقیقات تجربی و بالینی مورد استفاده قرار گیرند (Mohammadi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). بافت چربی به عنوان یک منبع غنی از سلول‌های بنیادی در نظر گرفته می‌شود. در این راستا فرکشن عروقی استروما جمعیت سلولی است که از بافت چربی پس از یک لیپوآسپیره جزئی به دست می‌آید. بخش عروقی استروما یک جمعیت سلولی پویا و ناهمگون است که شامل سلول‌های بنیادی/استرومال شبه مزانشیمی، پره‌ادیپوسیت‌ها، سلول‌های پروژنیتور اندوتلیال وپری‌سیت‌ها می‌باشد (Choi *et al.*, 2019; Magalon *et al.*, 2019) و یک گزینه‌ی درمانی جالب است زیرا روش برداشت آن امن بوده و سلول‌ها به تعداد قابل توجهی در دسترس هستند (Zuk *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2015; Solodeev *et al.*, 2018). سلول‌های فرکشن عروقی استروما دارای پتانسیل ترمیمی در ارگان‌ها یا بافت‌های آسیب دیده از طریق پاراکراین و مکانیزم‌های تمایزی هستند. همچنین سلول‌های بنیادی مشتق شده از فرکشن عروقی استرومای بافت چربی به راحتی می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی گسترش یابند و پتانسیل ایجاد رده‌های متنوعی از سلول‌ها را دارند. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های فرکشن عروقی مشتق شده از بافت چربی دارای آنتی ژن‌های سطحی متفاوتی هستند. CD مارکرها شناسه‌های مهم برای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از فرکشن عروقی استرومای مشتق شده از بافت چربی می‌باشند (Bora and Majumdar, 2017). پژوهش‌های قبلی نشان داده اند که سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی دارای CD مارکرهای ویژه‌ای هستند و در مقابل برای برخی CD مارکرها منفی هستند (Bora and Majumdar, 2017). CD34 غالباً به عنوان نشانگر سلول‌های بنیادی/استرومایی/پروژنیتور مشتق از چربی مطرح می‌باشد (Suga *et al.*, 2009). همچنین سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی معمولا برای مارکرهای CD73 و CD90 مثبت در نظر گرفته می‌شود (Bora and Majumdar, 2017). اجزای فرکشن عروقی استروما مشتق از بافت چربی ترکیبی از CD مارکرهای مثبت و منفی است. به عنوان مثال برای مجموعه مارکرهای مرتبط به سلول اندوتلیال، مارکرهای CD31، CD144، VEGFr2 و فاکتور فون ویلبراند (Von willebrand) مثبت در نظر گرفته می‌شود (Cousin *et al.*, 2003; Bourin *et al.*, 2013). با توجه به افزایش کاربردهای فرکشن عروقی استروما مشتق شده از بافت چربی در پزشکی ترمیمی، مهندسی بافت و همچنین در جراحی‌های زیبایی و درمان اختلالات ایمنی ، بافت چربی به عنوان یک منبع سلولی جالب، مورد توجه قرار گرفته است (Han *et al.*, 2015; Bora and Majumdar, 2017). در حال حاضر کاربردهای بالینی فرکشن عروقی استروما برای درمان بیماری‌های مختلف، بسیار امید بخش است. این تحقیقات جدید در رابطه با استفاده از این سلول‌ها در ترمیم زخم، ایسکمی عروقی، ترمیم استخوان، نقص‌های بافت غضروفی، آسیب‌های قلبی عروقی می‌باشند. سلول‌های مشتق از فرکشن عروقی استروما نسبتا" راحت و سریع بدون نیاز به پردازش و کشت سلولی به دست می‌آیند (Mizuno, 2009; Francis *et al.*, 2019). در واقع بافت چربی بیشترین غلظت از سلول‌های بنیادی را نسبت به تمام بافت‌ها دارد (Alabdulkarim *et al.*, 2017). گرچه بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی دارای کاربردهای وسیعی می‌باشند، در مقابل نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی می‌توانند سبب تومورزایی شوند؛ بنابراین، استفاده از آن برای درمان بیماران باید با دقت مورد توجه قرار گیرد (Chandler *et al.*, 2012).

هدف از پژوهش حاضر نحوه‌ی جداسازی و بررسی CD مارکرهای سلولی به منظور تعیین انواع سلول‌های موجود در جمعیت سلولی فرکشن عروق استرومای بافت چربی انسان می‌باشد. پس از جداسازی و تعیین ویژگی های سلول‌های بخش عروق استرومای حاصل از بافت چربی انسان می‌توان از این سلول‌ها در درمان انواع بیماری‌ها استفاده کرد.

روش مطالعه

مجوز اخلاق و کسب رضایت نامه: در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 در تاریخ ۱۳۹۷/۷/۲۶ و نیز از طرف سازمان پزشکی قانونی کشور با شناسه IR.LMO.REC.1397.021 در تاریخ ۱۳۹۷/۸/۱۲ دریافت شد.

جمع‌آوری نمونه بافت چربی: پس از کسب رضایت نامه‌ی کتبی از ۱۰ زن سالم ۳۰ تا ۵۸ ساله متقاضی ابدومینوپلاستی، بافت چربی با استفاده از تکنیک ابدومینوپلاستی از بیمار دریافت شد و در کول باکس ۲ تا ۸ درجه سانای‌گراد به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد.

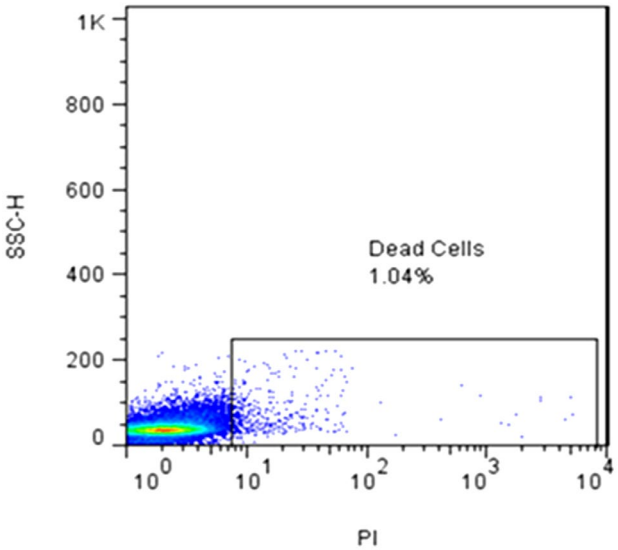
جداسازی فرکشن عروق استروما از بافت چربی: بافت چربی چندین بار شستشو داده شد و سپس با تیغ بیستوری به قطعات ریز برش زده شد. سپس برای جداسازی مایع از چربی، نمونه ابتدا به مدت ۱ دقیقه با دور ۵۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، با پیپت ۲۵ ml به حالت چرخاندن آن در سطح چربی، شروع به کشیدن چربی شد، به طوری که مایع زیر چربی وارد پیپت نشود. حدود ۲۵ ml از چربی در یک فالکون جدید ریخته شد. از محیط اولیه باقیمانده در زیر فالکون سانتریفیوژ شده در مرحله قبل ۳ ml برداشته و جهت تست میکروبی به آزمایشگاه میکروبی ارسال شد. در مرحله بعد به میزان ۳ PBS ml منفی به فالکون حاوی چربی اضافه شد تا حجم نهایی به ۴۵ ml برسد. سپس به مدت ۱ دقیقه و با دور ۵۰۰ PRM سانتریفوژ شد. چربی رویی که بعد از سانتریفیوژ به دست آمد، به دو قسمت مساوی تقسیم و در دو فالکون ریخته شد. بعد از اضافه نمودن کلاژناز ۰.۲٪ به هر فالکون، فالکون‌ها در مدت زمان نیم ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و لازم به ذکر است که هر ۵ دقیقه فالکون ها به شدت تکان داده شد. بعد از نیم ساعت هر فالکون حاوی چربی به دو فالکون مساوی تقسیم شد و حجمی برابر حجم نمونه و آنزیم، محیط αMEM+10%FBS جهت خنثی سازی آنزیم کلاژناز اضافه شد. در ادامه محصول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ PRM سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی کشیده شد و رسوب باقی مانده با 25 ml نرمال سالین سوسپانس شد و از فیلتر مش۷۰ میکرومتر عبور داده شد. سپس محیط نرمال سالین حاوی سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ PRM سانتریفیوژ شد. از محیط رویی تست میکروبی به آزمایشگاه میکروبی ارسال شد، همچنین ۱ میلی‌لیتر برای انجام تست‌های مایکوپلاسما و اندوتوکسین برداشته شد و SVF حاصله با دستگاه نوکلئوکانتر شمارش شد و با توجه به تعداد سلول شمارش شده محاسبه شد که چه تعداد سلول در چند فلاسک کشت داده شود. بدین ترتیب سلول‌ها در محیط گرم سوسپانس شد و میزان مشخصی سوسپانس سلولی و محیط به داخل هر فلاسک اضافه شد. در فواصل چهار روز تعویض محیط انجام شد.

بررسی میزان زنده‌مانی و تعداد سلول‌ها در روز جداسازی: ۱ سی سی از سلول‌ها پس از جداسازی با روش آنزیمی جهت بررسی میزان زنده مانی سلول‌ها (Kamrani *et al.*, 2021) به بخش فلوسایتومتری ارسال شد، همچنین سلول‌ها با استفاده از دستگاه شمارشگر سلول [Automated cell counter (Chemometec)] مورد شمارش قرار گرفتند.

بررسی مارکرهای سطحی: جهت بررسی CD مارکرها، نمونه به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال شد. ابتدا لوله‌های آزمایش به شرح زیر تهیه شدند: در لوله اول ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD3-PE و ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD19-FITC (به عنوان مارکرهای منفی) ریخته شد. در لوله دوم ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD38 (به عنوان مارکر منفی) ریخته شد. در لوله سوم ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD16-FITC و ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD29-PE (به عنوان مارکرهای مثبت) ریخته شد. در لوله چهارم ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD45-FITC و ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD34-PE (به عنوان مارکرهای مثبت) ریخته شد. در لوله پنجم ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD31-FITC و ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD73-PE (به عنوان مارکرهای مثبت) ریخته شد. در لوله ششم ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD90-FITC و ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD105-PE (به عنوان مارکرهای مثبت) ریخته شد. در لوله هفتم هیچ آنتی‌بادی ریخته نشد. از سویی، نمونه‌های سلولی تریپسینه گردیدند و در یک میلی‌لیتر محیط کشت فاقد سرم سوسپانس شده و به میکروتیوب منتقل شدند. از میکروتیوب حاوی سلول، ۷۰ میکرولیتر به لوله‌ها ریخته شد. لوله‌ها به وسیله ورتکس، میکس شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند و در انتها فلوسایتومتری انجام گردید. جهت بررسی‌های داده‌ها از آمار توصیفی استفاده شد.

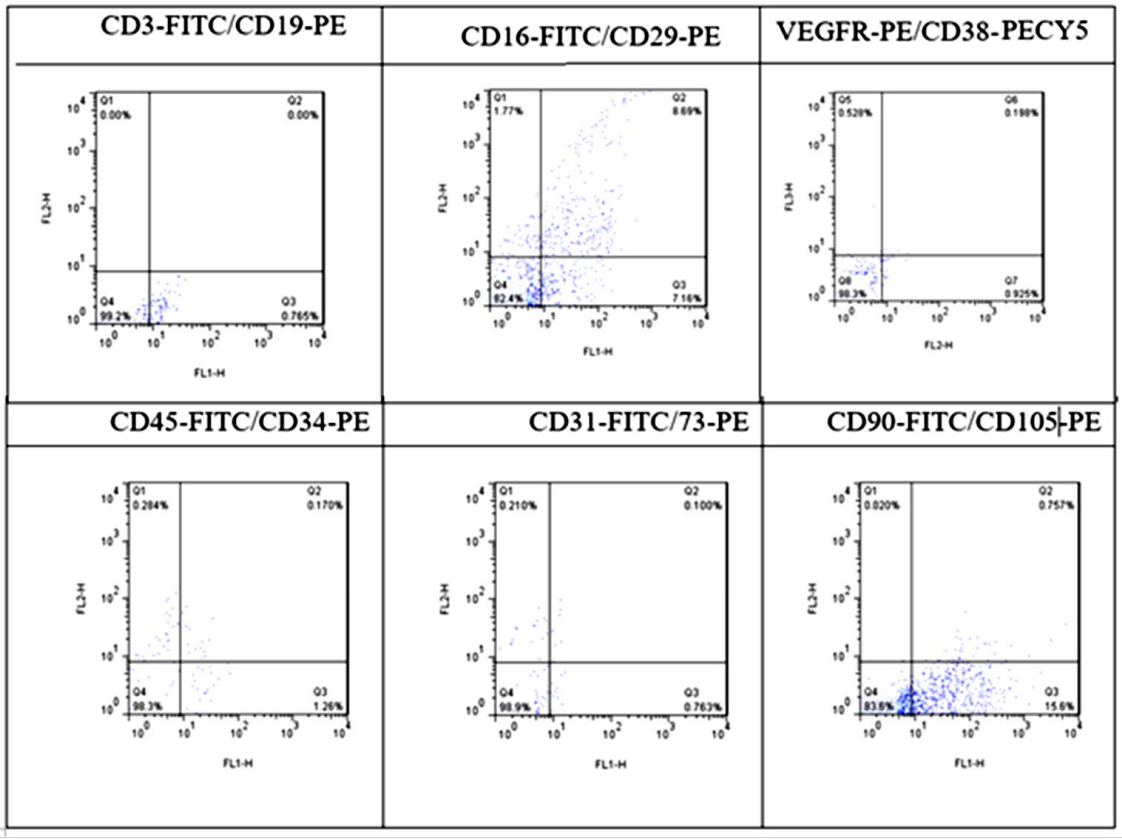
نتایج

شمارش سلول‌ها توسط دستگاه شمارشگر نشان داد که تعداد سلول‌های موجود در هر نمونه سلولی برابر ۲۴×۱۰^۶ بود. از طرفی بررسی زنده مانی سلول‌های فرکشن عروق استرومای بافت چربی در روز جداسازی به روش فلوسایتومتری نشان داد میزان سلول‌های زنده ۹۸٪/۰۶ و سلول‌های مرده ۱/۰۴٪ بود (شکل ۱).



شکل ۱– بررسی زنده مانی سلول‌های فرکشن عروق استرومای بافت چربی در روز جداسازی با استفاده از فلوسایتومتری.

آنالیز نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های فرکشن عروق استرومای بافت چربی نسبت به مارکرهای CD16، CD34، CD73، CD29، CD105، CD31 و CD45 مثبت بوده و نسبت به مارکرهای CD3، CD19 و CD38 منفی بودند. این امر نشانگر آن بود که سلول‌های جدا شده از فرکشن عروق استرومای بافت چربی از انواعی از سلول‌ها مشتمل بر سلول‌های بنیادی، پری ادیپوسیت، اندوتلیال و ماکروفاژ تشکیل شده بود (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی فلوسایتومتری CD مارکرها در سلول‌های جدا شده از فرکشن عروق استرومای بافت چربی

بحث

سلول‌های بنیادی و نیز سلول‌های غیر بنیادی حاصل از فرکشن بافت چربی در کارآزمایی‌های بالینی به دلیل دسترسی، توانایی تکثیر و تمایز بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lalu *et al.*, 2010; Chandler *et al.*, 2012). این سلول‌ها نقش مهمی در پزشکی ترمیمی بازی می‌کنند (Mazini *et al.*, 2019; Senesi *et al.*, 2019). بنابراین، مطالعه در خصوص جداسازی سلول‌های بنیادی و غیر بنیادی به ویژه از فرکشن عروق استرومای بافت چربی، حایز اهمیت خواهد بود.

در مقایسه با فرکشن مغز استخوان که دارای سلول‌های بنیادی می‌باشد، فرکشن عروقی استرومای مشتق از بافت چربی شامل درصد بیشتری از عناصر استروما می‌باشد. سلول‌های رده اندوتلیال، هماتوپوئتیک و پری سیتیک به ترتیب ۱۰-۲۰٪، ۲۰-۴۵٪ و ۳-۵٪ از کل سلول‌های هسته دار فرکشن عروقی استرومای بافت چربی را تشکیل می‌دهند (Han *et al.*, 2015; Bora and Majumdar, 2017). درجه‌ی ناهمگونی سلول‌ها تا حدی به محلی که بافت چربی ذخیره شده و پروتکلی که برای هضم آن استفاده می‌شود، بستگی دارد. اطلاعات کافی از تاثیر روش‌های مکانیکی و آنزیمی مختلف بر بیان آنتی‌ژنی سلول‌ها وجود ندارد، زیرا یک مارکر منحصر به فرد برای تشخیص زیرگروه‌های فرکشن عروقی استروما وجود ندارد. بنابراین، پیشنهاد شده که از تشخیص چند رنگی همراه با آنتی بادی‌های فلوروکروم برای آنتی ژن‌های سطحی استفاده شود (Bowles *et al.*, 2018). مطالعات اخیر پیشنهاد کرده‌اند که در پروتکل جداسازی، درصد سلول‌های مرده می‌بایست محدود بوده و در مقابل زنده‌مانی باید بیشتر

از ۷۰ درصد باشد (Han *et al.*, 2015). همچنانکه در پژوهش حاضر میزان زنده مانی سلول‌ها بیش از ۹۸ درصد بوده است. از سویی منطبق بر اصول و روش‌های مورد استفاده در این پژوهش در مطالعات قبلی نیز به منظور بررسی اجزای استرومای فرکشن عروقی مشتق از بافت چربی از نظر ایمونوفنوتایپینگ و مارکرهای سطحی ترکیبی از مارکرهای مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که سلول‌های فرکشن عروق استرومای بافت چربی نسبت به مارکرهای CD16، CD34، CD73، CD29، CD105، CD31 و CD45 مثبت بوده و نسبت به مارکرهای CD3، CD19 و CD38 منفی بودند. در واقع و بر اساس مطالعات قبلی (Mildmay-White and Khan, 2017) مارکرهای CD34، CD29 و CD105 به علت حضور سلول‌های بنیادی مشتق از چربی مثبت بود. همچنین مارکر CD31 نیز به علت حضور سلول‌های آندوتلیالی مثبت بوده، مارکرهای CD45 و CD34 به واسطه حضور سلول‌های پری‌ادیپوسیت مثبت بودند. از طرفی مارکرهای CD73 و CD 90 به علت حضور سلول‌های ماکروفاژ مثبت بودند. از آنجا که CD3 بیومارکر سلول‌های T می‌باشد، منفی بودن فرکشن عروق استرومای حاصل از بافت چربی نسبت به این بیومارکر بیانگر فقدان سلول‌های T در نمونه بود. منفی بودن فرکشن نسبت به CD19 نیز بیانگر عدم وجود سلول‌های B در نمونه بوده، و منفی بودن نسبت به CD38 احتمالا نشانگر عدم وجود گلبول‌های سفید در نمونه بود. در این راستا بررسی‌های پیشین بیانگر آن است که CD45 یک مارکر کلاسیک برای مشخص کردن سلول‌هایی با منشا هماتوپوئتیک به جز گلبول قرمز است و باید برای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی منفی در نظر گرفته شود. از سویی، بیان CD34 بین سلول‌های بنیادی/پروژنیتور هماتوپوئتیک و سلول‌های اندوتلیال مشترک است. همچنین باید به عنوان یک مارکر بالقوه برای شناسایی جمعیت سلولی استرومال نیز استفاده شود (Mildmay-White and Khan, 2017). برخی مطالعات جمعیت سلولی موجود در فرکشن عروق استروما را براساس مارکرهای +CD34، -CD31، -CD235a و -CD45 مشخص می‌کنند (Bourin *et al.*, 2013).

مطالعه حاضر در حیطه‌ی بررسی تنوع جمعیت سلولی موجود در فرکشن عروقی استرومای مشتق از بافت چربی انسان انجام گرفته است و تفسیر نتایج در این حیطه قابل تبیین می‌باشد. با توجه به محدودیت پشتیبانی مالی و تسهیلات در دسترس، امکان بررسی موضوع در سطح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه میکروسکوپ الکترونی فراهم نگردید. امید است در آینده امکان بررسی این موضوع از نظر ویژگی‌های زیستی در سطح سلولی و مولکولی فراهم آید و همچنین پتانسیل این سلول‌ها در پزشکی ترمیمی و سلول درمانی بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشانگر غنی بودن تنوع جمعیت سلولی موجود در فرکشن عروق استرومای بافت چربی بوده به طوری که این فرکشن حاوی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، سلول‌های آندوتلیالی، پری‌ادیپوسیت و ماکروفاژ می‌باشد، گرچه از نظر سلول‌های ایمنی به ویژه سلول‌های T و B منفی است و با توجه به غنی بودن بافت چربی از سلول‌های مختلف می‌توان از این سلول‌های در حیطه ی سلول درمانی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته و بدینوسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت‌های مالی این مرکز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

مراجع

Alabdulkarim, Y., Ghalimah, B., Al-Otaibi, M., Al-Jallad, H.F., Mekhael, M., Willie, B. and Hamdy, R. 2017. Recent advances in bone regeneration: The role of adipose tissue-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells. Journal of Limb Lengthening & Reconstruction, 3(1): 4.

Bora, P. and Majumdar, A.S. 2017. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. Stem cell research & therapy, 8(1): 1-10.

Bourin, P., Bunnell, B.A ,.Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K. and Gimble, J.M. 2013. 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, 15(6): 641-648.

Bowles, A.C., Tucker, A. and Bunnell, B.A. 2018. Isolation and flow cytometric analysis of

the stromal vascular fraction isolated from mouse adipose tissue. In: Adipose-derived stem cells. Springer: pp: 1-9.

Chandler, E.M., Seo, B.R., Califano, J.P., Eguiluz, R.C.A., Lee, J.S., Yoon, C.J., Tims, D.T., Wang, J.X., Cheng, L. and Mohanan, S. 2012. Implanted adipose progenitor cells as physicochemical regulators of breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(25): 9786-9791.

Choi, J.S., Chae, D.-S., Ryu, H.A. and Kim, S.-W. 2019. Transplantation of human adipose tissue derived-svf enhance liver function through high anti-inflammatory property. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1864(12): 158526.

Cousin, B., André, M., Arnaud, E., Pénicaud, L. and Casteilla, L. 2003. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. Biochemical and biophysical research communications, 301(4): 1016-1022.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating ,A., Prockop, D. and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy, 8(4): 315-317.

Francis, A., Wang, W.Z., Goldman, J.J., Fang, X.-H ,.Williams, S.J. and Baynosa, R.C. 2019. Enhancement of viable adipose-derived stem cells in lipoaspirate by buffering tumescent with sodium bicarbonate. Plastic and Reconstructive Surgery Global Open, 7.(۳)

Gimble, J.M., Bunnell, B.A., Frazier, T., Rowan ,B., Shah, F., Thomas-Porch, C. and Wu, X. 2013. Adipose-derived stromal/stem cells: A primer. Organogenesis, 9(1): 3-10.

Han, S., Sun, H.M., Hwang, K.-C. and Kim, S.-W. 2015. Adipose-derived stromal vascular fraction cells: Update on clinical utility and efficacy. Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 25 (2): 145-152.

Horwitz, E., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R., Krause, D. and Keating, A. 2005. Clarification of the nomenclature for msc: The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy, 7(5): 393-395.

Hui, H., Tang, Y., Hu, M. and Zhao, X. 2011. Stem cells: General features and characteristics. In: Stem cells in clinic and research. IntechOpen.

Kamrani, Z., Heshmati, M .and Babashah, S. 2021. Evaluation effects of silymarin on cytotoxicity and apoptosis on sw480 colon cancer cell line. Journal of Research in Karyotic Cell &Tissue, 1(3): 8-15.

Lalu, M.M., McIntyre, L., Pugliese, C. and Stewart, D.J. 2010. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (mscs): A systematic review. D49. Clinical Trials In Critical Care: A6043-A6043.

Liu, Z., Zhang, Y., Xiao, H., Yao, Z., Zhang, H., Liu, Q., Wu, B., Nie, D., Li, Y. and Pang, Y. 2017. Cotransplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe aplastic anemia: An interim summary for a multicenter phase ii trial results. Bone marrow transplantation, 52(5): 704-710.

Magalon, J., Velier, M., Simoncini, S., François, P., Bertrand, B., Daumas, A., Benyamine, A., Boissier, R., Arnaud, L. and Lyonnet, L. 2019. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. Annals of the rheumatic diseases, 78(3): 391-398.

Mazini, L., Rochette, L., Amine, M. and Malka, G. 2019. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (adscs), comparison with mesenchymal stem cells (mscs). International journal of molecular sciences, 20(10): 2523.

Mildmay-White, A. and Khan, W. 2017. Cell surface markers on adipose-derived stem cells: A systematic review. Current Stem Cell Research & Therapy, 12(6): 484-492.

Mizuno, H. 2009. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. Journal of Nippon Medical School, 76(2): 56-66.

Mohammadi, Z., Afshari, J.T., Keramati, M.R., Alamdari, D.H., Ganjibakhsh, M., Zarmehri, A.M., Jangjoo, A., Sadeghian, M.H., Ameri, M.A. and Moinzadeh, L. 2015. Differentiation of adipocytes and

osteocytes from human adipose and placental mesenchymal stem cells .Iranian journal of basic medical sciences, 18(3): 259.

Raščanin, S., Rančić, N., Dragović, S. and Jovanović, M. 2019. Embryonic stem cells: Where do we stand at the moment? Acta Medica Medianae, 58(3): 138-146.

Senesi, L., De Francesco, F., Farinelli, L ,.Manzotti, S., Gagliardi, G., Papalia, G.F., Riccio, M. and Gigante, A. 2019. Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: Preliminary results. Frontiers in cell and developmental biology, 7: 88.

Solodeev, I., Meilik, B., Volovitz, I., Sela, M., Manheim, S., Yarkoni, S., Zipori, D., Gur, E. and Shani, N. 2018. Fas-l promotes the stem cell potency of adipose-derived mesenchymal cells. Cell death & disease, 9(6): 1-13.

Suga, H., Matsumoto, D., Eto, H., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J. and Yoshimura, K. 2009. Functional implications of cd34 expression in human adipose–derived stem/progenitor cells. Stem cells and development, 18(8): 1201-1210.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang ,J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell, 13(12): 4279-4295.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 2, Issue 1, 2021 Pages 8-14

Research Article

Isolation and evaluation of human adipose tissue characterization for preparation of vascular stem cells

Sona Zare[1], Mohammadali Nilforoushzade[1], Rahim Ahmadi[2,*], and Zahra Esmaeili[3]

[1] Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

[3] Department of Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence to Rahim Ahmadi, Ph.D., drrahahmadi@yahoo.com

Received 26th January 2021 Revised 3rd April 2021 Accepted 9th June 2021

Abstract

Introduction and Aim: Several studies have been carried out on the biological characteristics of a human adipose tissue-derived-stromal vascular fraction. However, investigating this fraction concerning its clinical application is still of significant importance. The aim of this study was to isolate and evaluate the cell population of human adipose stromal vascular fraction with the main aim of investigating the presence of stem cells in human adipose stromal vascular fraction.

Methods: In this laboratory-experimental study adipose tissues were obtained from 10 healthy individuals (30 to 58 years) and maintained in standard condition. After enzymatic isolation, the viability of stromal vascular fraction cells and surface antigens was evaluated by flow cytometry.

Results: The results of this study showed that adipose stromal vascular fraction cells had high viability (> 98%) and were positive for CD16, CD34, CD73, CD29, CD105, CD31, and CD45 markers and negative for CD3, CD19, and CD38 markers.

Conclusion: The findings of this study indicate the presence of adipose-derived stem cells, endothelial cells, peri-adipocytes, and macrophages. According to this, this fraction has potential in the clinical field of cell therapy.

***Keywords*:** Stromal vascular fraction, Adipose tissue, Cell population, CD marker