RECOMMENDATIONS

Based on our study we recommend the following;

- Using **protocol IIa** to isolate MSCs from adipose tissue.
- Testing of isolated stromal vascular fraction (SVF) cells for CD 31 expression using flow cytometery.
- Co-culture of the isolated AT-MSCs between ***day 10*** and **day 18** with mononuclear cells and analysis of cytokines in supernatant using Luminex 200 analyzer (Texas,USA) to study the effect of MSCs on T-lymphocytes which may be of great importance in transplantation field.

obeikandl.com

REFERENCES

1. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. Stem cells translational medicine. 2012;1(3):230-6.

2. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008;45(2):115-20.

3. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Stem cells international. 2013;2013:496218.

4. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. Journal of neuroscience research. 2002;69(6):908-17.

5. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell. 2002;13(12):4279-95.

6. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. Journal of embryology and experimental morphology. 1966;16(3):381-90.

7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 1991;9(5):641-50.

8. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. Journal of cell science. 2006;119(Pt 11):2204-13.

9. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Experimental hematology. 2004;32(5):414-25.

10. Ballas CB, Zielske SP, Gerson SL. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. Journal of cellular biochemistry Supplement. 2002;38:20-8.

11. Chao H, Hirschi KK. Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? Microvascular research. 2010;79(3):169-73.

12. Chen WC, Park TS, Murray IR, Zimmerlin L, Lazzari L, Huard J, et al. Cellular kinetics of perivascular MSC precursors. Stem cells international. 2013;2013:983059.

13. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25(11):2739-49.

obeikandl.com

14. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells (Dayton, Ohio). 2006;24(5):1294-301.

15. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. Cell biology international. 2008;32(4):384-93.

16. Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. Cellular & molecular biology letters. 2011;16(3):493-514.

17. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem cells (Dayton, Ohio). 2008;26(3):591-9.

18. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. Blood. 1993;81(7):1679-90.

19. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. Haematologica. 2001;86(10):1099-100.

20. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. Circulation research. 2004;95(7):671-6.

21. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell stem cell. 2008;3(3):301-13.

22. Zebardast N, Lickorish D, Davies JE. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing. Organogenesis. 2010;6(4):197-203.

23. Cai X, Lin Y, Hauschka PV, Grottkau BE. Adipose stem cells originate from perivascular cells. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization. 2011;103(9):435-47.

24. James AW, Zara JN, Corselli M, Askarinam A, Zhou AM, Hourfar A, et al. An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering. Stem cells translational medicine. 2012;1(9):673-84.

25. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. Stem cells international. 2013;2013:732742.

26. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. The Journal of pathology. 2009;217(2):318-24.

operandi.com

27. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

28. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. Science (New York, NY). 2005;309(5737):1074-8.

29. Hong JH, Yaffe MB. TAZ: a beta-catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2006;5(2):176-9.

30. Cho HH, Shin KK, Kim YJ, Song JS, Kim JM, Bae YC, et al. NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression. Journal of cellular physiology. 2010;223(1):168-77.

31. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. Annals of plastic surgery. 2008;60(5):538-44.

32. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Experimental hematology. 2000;28(8):875-84.

33. Levi B, James AW, Glotzbach JP, Wan DC, Commons GW, Longaker MT. Depot-specific variation in the osteogenic and adipogenic potential of human adipose-derived stromal cells. Plastic and reconstructive surgery. 2010;126(3):822-34.

34. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. Cell stem cell. 2011;9(1):11-5.

35. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. Arthritis and rheumatism. 2007;56(4):1175-86.

36. Caplan AI. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. Connective tissue research. 1995;31(4):S9-14.

37. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. Journal of cellular biochemistry. 2006;98(5):1076-84.

38. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2004;32(6):370-3.

39. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. Tissue engineering. 2006;12(12):3375-82.

Obrixandri.com

40. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. Aesthetic plastic surgery. 2008;32(1):48-55; discussion 6-7.

41. Rosen ED. The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002;979:143-58; discussion 88-96.

42. Alvarez PD, Garcia-Arranz M, Georgiev-Hristov T, Garcia-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. Thorax. 2008;63(4):374-6.

43. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(13):8932-7.

44. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone marrow transplantation. 2002;30(4):215-22.

45. Krivit W, Aubourg P, Shapiro E, Peters C. Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. Current opinion in hematology. 1999;6(6):377-82.

46. Peters C, Shapiro EG, Anderson J, Henslee-Downey PJ, Klemperer MR, Cowan MJ, et al. Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. The Storage Disease Collaborative Study Group. Blood. 1998;91(7):2601-8.

47. Field RE, Buchanan JA, Copplemans MG, Aichroth PM. Bone-marrow transplantation in Hurler's syndrome. Effect on skeletal development. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1994;76(6):975-81.

48. Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Cytotechnology. 2014.

49. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815-22.

50. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. Diabetes. 2008;57(7):1759-67.

51. Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2003;171(7):3426-34.

opkamal.com

52. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Experimental hematology. 2003;31(10):890-6.

53. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. Journal of biomedical science. 2005;12(1):47-57.

54. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. Journal of internal medicine. 2007;262(5):509-25.

55. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002;99(10):3838-43.

56. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003;75(3):389-97.

57. Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, Park MK, Heo YM, Cho ML, et al. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. Immunology letters. 2010;127(2):150-6.

58. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Immunology letters. 2009;126(1-2):37-42.

59. Abe K, Yarovinsky FO, Murakami T, Shakhov AN, Tumanov AV, Ito D, et al. Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. Blood. 2003;101(4):1477-83.

60. Maldonado-Lopez R, Moser M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. Seminars in immunology. 2001;13(5):275-82.

61. Ritter U, Meissner A, Ott J, Korner H. Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin-alpha reveals an essential role for TNF. Journal of leukocyte biology. 2003;74(2):216-22.

62. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2006;177(4):2080-7.

63. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. Journal of inflammation (London, England). 2005;2:8.

64. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2006;24(1):74-85.

65. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood. 2006;107(1):367-72.

66. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. European journal of immunology. 2005;35(5):1482-90.

67. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood. 2007;110(10):3499-506.

68. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, et al. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. Journal of biomedicine & biotechnology. 2012;2012:295167.

69. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2008;26(1):212-22.

70. Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis research & therapy. 2010;12(6):R210.

71. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. Autoimmunity reviews. 2011;10(7):410-5.

72. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. Gut. 2009;58(7):929-39.

73. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004;363(9419):1439-41.

74. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25(8):2025-32.

75. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. PloS one. 2010;5(12):e14247.

76. Mayer CT, Floess S, Baru AM, Lahl K, Huehn J, Sparwasser T. CD8+ Foxp3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+ Foxp3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. European journal of immunology. 2011;41(3):716-25.

77. Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, et al. IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. International immunology. 2010;22(2):129-39.

78. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 2004;103(12):4619-21.

79. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem cells (Dayton, Ohio). 2004;22(7):1338-45.

80. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood. 2003;102(4):1548-9.

81. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica. 2003;88(8):845-52.

82. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem cells (Dayton, Ohio). 2004;22(4):625-34.

83. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. The Journal of experimental medicine. 2004;200(2):123-35.

84. Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. Stem cells and development. 2005;14(3):252-65.

85. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation. 2006;81(10):1390-7.

86. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. Neurological research. 2006;28(5):523-6.

87. Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, et al. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. Circulation. 2006;114(1 Suppl):I114-9.

88. Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. Nature reviews Clinical oncology. 2014;11(9):536-47.

Obstkarton.com

89. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. Nature reviews Immunology. 2002;2(4):273-81.

90. Tran-Dinh A, Kubis N, Tomita Y, Karaszewski B, Calando Y, Oudina K, et al. In vivo imaging with cellular resolution of bone marrow cells transplanted into the ischemic brain of a mouse. NeuroImage. 2006;31(3):958-67.

91. Chamberlain G, Smith H, Rainger GE, Middleton J. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear. PloS one. 2011;6(9):e25663.

92. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. Stem cells and development. 2009;18(5):683-92.

93. Lin P, Lin Y, Lennon DP, Correa D, Schluchter M, Caplan AI. Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. Stem cells translational medicine. 2012;1(12):886-97.

94. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. Cells, tissues, organs. 2001;169(1):12-20.

95. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25(2):371-9.

96. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science (New York, NY). 1999;284(5411):143-7.

97. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. Journal of dental research. 2009;88(9):792-806.

98. Zeng G, Lai K, Li J, Zou Y, Huang H, Liang J, et al. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells. Organogenesis. 2013;9(4):287-95.

99. Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2014;16(2):170-80.

100. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. BioMed research international. 2014;2014:951512.

101. Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z. Adipose-derived stem cells. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2008;449:59-67.

102. Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL. Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. Stem cells (Dayton, Ohio). 2008;26(10):2664-5.

obeikandi.com

103. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Cytotherapy. 2013;15(6):641-8.

104. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. World journal of stem cells. 2014;6(3):256-65.

105. Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. European cells & materials. 2010;20:121-33.

106. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25(11):2896-902.

107. Cervelli V, Scioli MG, Gentile P, Doldo E, Bonanno E, Spagnoli LG, et al. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. Stem cells translational medicine. 2012;1(3):206-20.

108. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. Circulation research. 2008;102(1):77-85.

109. Mischen BT, Follmar KE, Moyer KE, Buehrer B, Olbrich KC, Levin LS, et al. Metabolic and functional characterization of human adipose-derived stem cells in tissue engineering. Plastic and reconstructive surgery. 2008;122(3):725-38.

110. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2006;24(2):462-71.

111. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. Journal of biological regulators and homeostatic agents. 2001;15(1):1-13.

112. Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. World journal of stem cells. 2013;5(1):1-8.

113. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. Stem cells international. 2012;2012:812693.

الملخص العربى

لقد أعطى العلاج باستخدام الخلايا الجذعية أملا جديدا في الشفاء من الأمراض العضوية التي من الصعب علاجها بالطرق العادية. و قد جذبت الخلايا الجذعية الوسطية اهتمام العديد من العلماء في مختلف أنحاء العالم في الآونة الأخيرة لقدرتها على التحول لأنواع مختلفة من الخلايا اذا توافرت لها الظروف المناسبة.

الخلايا الجذعية الوسطية هي خلايا متعددة القدرات ، لها شكل يشبه الخلايا الليفية ، و تمتلك القدرة على التحول خارج الجسم اذا توافرت لها الظروف المناسبة الى بانيات و خلايا غضروفية و خلايا دهنية. و وجد أيضا بجانب قدراتها المتعددة أنها تمتلك القدرة على تنظيم الجهاز المناعي لأنها لا تمتلك الذرات المحفزة للجهاز المناعي مثل: س د ٨٠ و س د ٨٦ و أيضا كمية مهملة أو شبه منعدمة من ه ل أ- د ر.

و تم اكتشاف الخلايا الجذعية الوسطية بواسطة العالم **فردنشتين و زملاؤه** في عام ١٩٧٦ عن طريق زراعة نخاع العظام في أطباق زراعة معقمة مصنوعة من البلاستيك وبعد التخلص من الخلايا الجذعية المنتجة للدم الغير الملتصقة بالبلاستيك الخاص بالأطباق و التعرف على الخلايا شبه الليفية الملتصقة بالبلاستيك الخاص بالأطباق. و أيضا لاحظوا قدرة هذه الخلايا على التحول الى عظم أو غضروف.

و قد أطلق المجتمع الدولي للعلاج بالخلايا الجذعية **ثلاث** خصائص للتعرف على هذه الخلايا وهي كالآتي: القدرة على الالتصاق بالبلاستيك ، **امتلاك** س د ٩٠ ، س د ٧٣ ، س د ١٠٥ و **عدم امتلاك** س د ٤٥، س د ٣٤، س د ١٤ أو س د ١١ب ، س د ١٩ أو س د ٧٩أ ، ه ل أ-د ر و القدرة على التحول خارج الجسم اذا توافرت الظروف المناسبة الى بانيات و خلايا غضروفية و خلايا دهنية.

و يعتبر **نخاع العظام** أحد المصادر الرئيسية للحصول على الخلايا الجذعية الوسطية و لكن توجد العديد من الأسباب التى تعيق استخدامه للحصول على هذه الخلايا و من أهم هذه الأسباب أن عملية الحصول على نخاع العظام تعتبر عملية غزوية و لذلك وجب البحث على مصدر آخر. **الأنسجة الدهنية** تعتبر من المصادر المفضلة المستخدمة لأنه يمكن الحصول عليه بسهولة و بكميات كبيرة و يحتوي على العديد من الخلايا الجذعية الوسطية.

و قد قام العديد من العلماء باستخراج الخلايا الجذعية الوسطية من الأنسجة الدهنية مستخدمين العديد من الطرق و لكن حتى الآن لا يوجد طريقة موحدة متعارف عليها و لذلك كان الهدف من هذه الدراسة ايجاد طريقة سهلة و ميسرة لاستخراج هذه الخلايا من الأنسجة الدهنية .

و قد قمنا بتجربة ا لعديد من الطرق التي تم ذكرها في المجلات العلمية حتى نجحنا في عمل طريقة سهلة لاستخراج الخلايا الجذعية الوسطية من الأنسجة الدهنية و هي كالآتي: الأنسجة الدهنية التي تم الحصول عليها من **٥ شخص** خضع لعملية شفط الدهون و تصغيير الثدي و ازالة الدهون الزائدة من منطقة البطن يتم غسلها بمحلول فوسفات ملحي معقم لعدد ٣-٤ مرات لتنظيفه، بعد ذلك يتم اضافة انزيم الكولاجينيز بتركيز (٠.٠٧٥%) لمدة ساعة في درجة حرارة ٣٧˚C في حمام مائي متحرك بسرعة ٥٠٠ رب م لهضم النسيج الدهني. بعد ساعة يتم ابطال الانزيم بكمية متساوية من الميديا ثم يتم تفريغ المحتويات في أنابيب فالكون ١٥ مل و لف المزيج على سرعة ٣٠٠٠ رب م لمدة ١٠ دقائق و يتم غسل الحبة الناتجة بعد ذلك في ٥ مل محلول فوسفات ملحي على سرعة ٢٠٠٠ ر ب م لمدة ٥ دقائق. ثم يتم اضافة محلول لتكسير كرات الدم الحمراء لمدة خمس دقائق و بعد ذلك يتم اضافة محلول فوسفات ملحي معقم و لفها على سرعة ٢٠٠٠ رب م لمدة خمس دقائق. في النهاية يتم زرع الكرية الناتجة في قوارير $T\text{-}25\ cm^2$ معقمة مع اضافة ميديا **د م ي م** ذات نسبة جلوكوز عالية و ل-جلوتامين + ١٠% مصل الجنين البقري و بعد ذلك يتم حفظها في جو رطب مكون من ٩٥% هواء و ٥% ثاني أكسيد الكربون في درجة حرارة ٣٧˚C. بعد مرور الليل يتم غسل القوارير بمحلول فوسفات ملحي معقم لازالة الخلايا الغير ملتصقة و بعد ذلك اضافة ميديا جديدة. تظهر أول خلية شبه ليفية ملتصقة في اليوم **الثاني** بعد الزرع، وفي اليوم **السابع** بعد الزرع يظهر ١٥- ٢٠ مجموعة من الخلايا شبه الليفية الملتصقة و تصل الي كثافة ٧٠% في اليوم **الخامس عشر** و الي ١٠٠ % في اليوم **الثامن عشر**.

عندما تصل الخلايا الي كثافة ٨٠ %-٩٠% يتم فكها باستخدام انزيم التريبسين بتركيز (٠.٠٥%) في درجة حرارة ٣٧˚C لمدة ١٠ دقائق و يتم تقسيم الكرية الناتجة على القوارير.

باستخدام جهاز التدفق الخلوي وجدنا أن الخلايا الملتصقة الشبه ليفية **تمتلك** س د ٣٤ ، س د ٩٠، س د ٧٣ ، س د ١٠٥ ، س د ٤٩د و **لا تمتلك** س د ٤٥، س د ١٤، س د ١٩ ، س د ٣ و ه ل أ-د ر .

جامعة الإسكندرية
كلية الطب
قسم الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية

عزل و تمييز الخلايا الجذعية الوسطية من الأنسجة الدهنية

رسالة مقدمة

لقسم الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية ـ كلية الطب ـ جامعة الإسكندرية
ضمن متطلبات درجة

الماجستير

فى

الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية

مـــن

هدير محمد السيد رشيد
بكالوريوس الطب والجراحة ، ٢٠٠٩
كلية الطب، جامعة الإسكندرية

[٣/ ٢٠١٥]

obeikandl.com

جامعة الإسكندرية
كلية الطب
قسم الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية

عزل و تمييز الخلايا الجذعية الوسطية من الأنسجة الدهنية

رسالة مقدمة من

هدير محمد السيد رشيد

للحصول على درجة

الماجستير

فى

الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية

لجنة المناقشة والحكم على الرسالة	**التوقيع**
أ.د/ مريم أبو سيف حلمى أستاذ الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية كلية الطب جامعة الإسكندرية	.....
أ.د/ أمانى فؤاد سرور أستاذ الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية كلية الطب جامعة الإسكندرية	.....
أ.د/ هالة جبر متولى أستاذ أمراض الدم والمناعة كلية الطب جامعة القاهرة	.....

التاريخ / /

obeikandi.com

لجنة الإشراف **موافقون**

أ.د/ مريم أبو سيف حلمي .....

أستاذ الباثولوجيا الاكلينيكية والكميائية
كلية الطب
جامعة الإسكندرية

المشرفان المشاركان

د/ أميرة ابراهيم فياض .....

مدرس الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية
كلية الطب
جامعة الإسكندرية
وذلك لخبرتها فى مجال المناعة

د/ أدهم فاروق محمد عبد العال .....
مدرس جراحة التجميل والإصلاح
كلية الطب
جامعة الإسكندرية
وذلك لخبرته فى مجال الجراحات التجميلية

obeikandl.com