

ایجاد شرایط بهینه کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به وسیله تیمار با غلظت سیپروفلوکساسین

خلاصه

مریم جهانگیری مقدم^۱
نکیسا ضرابی اهرابی^۱
سید مهدی طبایی^۲

مقدمه: در سال‌های اخیر مطالعات انجام شده در زمینه سلول‌های بنیادی باعث افزایش تقاضای درمان بیماری‌ها با استفاده از شیوه سلول‌درمانی شده است. بهبود در روش تکثیر سلول‌های بنیادی باعث افزایش استفاده از این سلول‌ها در فرآیندهای سلول‌درمانی می‌شود. هدف این تحقیق بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به وسیله تیمار این سلول‌ها با غلظت غیر سمی سیپروفلوکساسین است.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از بانک سلول‌های انسانی و جانوری، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید. این سلول‌ها از لحاظ کنترل کیفی ویروسی و کنترل کیفی میکروبی شامل باکتری، قارچ، مخمر و همچنین اثبات بنیادی بودن به وسیله قابلیت تمایز به سلول‌های استخوانی، چربی و شاخص‌های سطحی CD29، CD45، CD90، CD34 و CD105 با روش فلوسایتومتری تأیید شده بودند. میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد و با میکروسکوپ نوری عکس گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج تیمار سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین نشان داد که این ماده در غلظت‌های ۱۲ تا ۱/۵ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر، بر روی سلول‌ها اثر سمی و کشنده دارد و از غلظت ۱۵۰ تا ۰/۵ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر بر روی سلول‌ها اثر سمی ندارد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ نوری نیز شکل ظاهری سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر به عنوان یک مدل، نشان داد استفاده از سیپروفلوکساسین در طول دوره کشت با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر می‌تواند باعث ایجاد شرایط مناسب کشت و حفظ قابلیت بنیادی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در طول دوره کشت گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی بافت چربی، سیپروفلوکساسین، فلوسایتومتری

۱. گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه پژوهشی ترمیم نوری مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

۳. گروه پژوهشی لیزر پزشکی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: نکیسا ضرابی اهرابی، تلفن: ۰۲۱۴۴۶۰۰۱۸۴
پست الکترونیک: na_zarrabi@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر، مطالعات انجام شده در زمینه سلول‌های بنیادی باعث افزایش تقاضای درمان بیماری‌ها با استفاده از شیوه سلول درمانی گردیده است [۱]. یکی از سلول‌هایی که امروزه توجه محققان را به خود جلب کرده است و تحقیقات گسترده‌ای بر روی این سلول‌ها انجام شده است، سلول‌های بنیادی بزرگسالان می‌باشند که در بسیاری از بافت‌های تخصص‌یافته بدن از جمله بافت چربی، مغز استخوان، پالپ دندان، کبد، بافت قریه، شبکیه چشم و قسمت‌های مختلف بدن یافت می‌شوند [۲]. این تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی بزرگسالان همانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، مغز استخوان و پالپ دندان توانایی قابل توجهی برای معالجه بیماری‌ها و فرآیند سلول-درمانی را دارند [۳]. اهمیت و سرمایه‌گذاری بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پروسه سلول درمانی و تحقیقات پزشکی باعث شده است دستاوردهای علمی ارزشمند در این حوزه به سرعت نشر یابند و هر روز بیش‌ازپیش بر ارزش و اهمیت این تحقیقات بیفزاید [۴].

بهبود در روش تکثیر سلول‌های بنیادی بزرگسالان می‌تواند استفاده از این سلول‌ها را در فرآیندهای سلول درمانی افزایش دهد. در مطالعه‌ای که با استفاده از سلول‌های بنیادی پاپیلای درم انسان انجام گردیده، نتایج نشان داده است که تیمار سلول‌ها با سیپروفلوکساسین می‌تواند باعث جلوگیری از کاهش بنیادینگی سلول‌ها در طول کشت شود. در این تحقیق اینگونه بیان شده است که کلنی‌زایی و شاخص‌های بنیادی سلول‌های پاپیلای درمی در طول فرآیند کشت به تدریج و به صورت وابسته به زمان کاهش می‌یابد. با این حال تیمار سلول‌ها با غلظت غیر سمی سیپروفلوکساسین می‌تواند سبب حفظ مرفولوژی، کلنی‌زایی و مارکرهای سلول‌های بنیادی در آن‌ها شود. سیپروفلوکساسین اثر خود را از طریق مکانیسم وابسته به تیروزین کیناز وابسته به ATP/گلیکوکیناز سنتاز کیناز β اعمال می‌کند که به‌نوبه خود سبب افزایش β کانتین می‌شود. علاوه بر این، سیپروفلوکساسین سبب القاء تبدیل اپیتلیوم به مزانشیمی در سلول‌ها می‌شود به‌طوری‌که عوامل رونویسی ZEB1 و Snail به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابند.

یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در استفاده از سلول‌های بنیادی، ایجاد شرایط مناسب و ایدئال برای تکثیر این سلول‌ها بدون کاهش ویژگی‌های بنیادین آن‌ها در طول مراحل کشت است. همچنین جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافتی که در هنگام استحصال، کمترین آسیب را برای بیمار به‌همراه داشته باشد، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. امروزه، بافت چربی به‌عنوان منبعی با دسترسی آسان و کم‌خطر برای اهداف سلول درمانی به‌صورت اتولوگ مطرح است [۵]. لذا، باتوجه به اهمیت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در فرآیند سلول درمانی، در این تحقیق تأثیر غلظت غیر سمی داروی سیپروفلوکساسین در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بررسی گردید.

روش بررسی

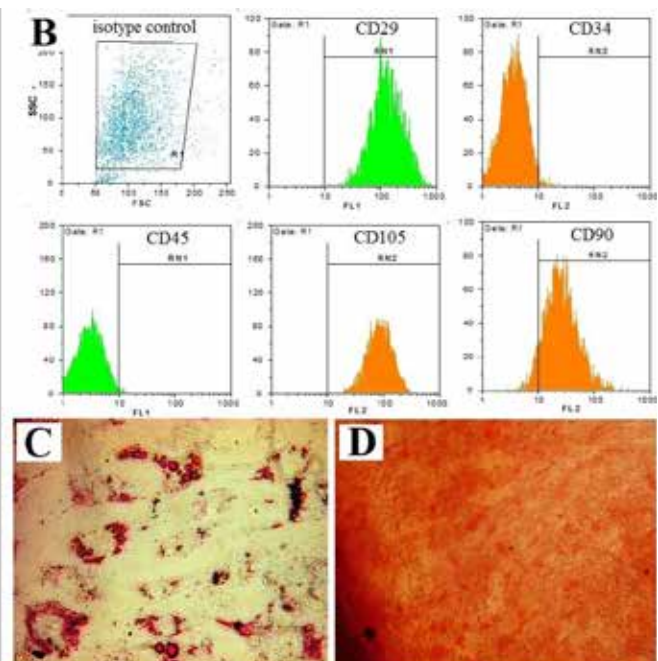
تهیه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

در این تحقیق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از بانک سلول‌های انسانی و جانوری مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (AD-MSC-02, IBRC C10889) تهیه گردید که در این بانک برای این نمونه سلولی، کنترل کیفی ویروسی نظیر HIV-I, HBV, HCV و EBV و میکروبی شامل باکتری، قارچ، مخمر و مایکوپلاسما انجام شده است. همچنین اثبات بنیادی بودن با بررسی قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان، چربی و بررسی شاخص‌های سطحی خاص سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD45, CD29, CD90, CD34 و CD105) با روش فلوسایتومتری (شکل ۱) انجام شده است [۶]. که اساس این روش بر خصوصیات پراکنده‌سازی نور لیزر توسط سلول‌ها و نیز نشر فلورسانس آن‌ها استوار است.

تعیین غلظت غیرسمی سیپروفلوکساسین به‌وسیله آزمایش MTT

آزمایش دی‌متیل‌تيازول، ۲، ۵، ۶-دی‌فیل‌تترازولیوم برمید (MTT) به صورت تکرار سه‌تایی برای هر غلظت سیپروفلوکساسین از غلظت ۵ میلی گرم تا ۱۰ میکروگرم به‌ازای هر میلی‌لیتر انجام شد. برای این منظور ابتدا تعداد هفت هزار سلول بنیادی مشتق از بافت چربی در حجم ۱۰۰ μ l محیط کشت این سلول‌ها به هر چاهک ظرف ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس ظرف مورد نظر به مدت ۱۸ ساعت در شرایط انکوباتور CO₂ ۵ درصد، رطوبت ۱۰۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از گذشت این زمان، غلظت‌های مورد نظر سیپروفلوکساسین به چاهک‌ها اضافه شد. سپس انکوباسیون با شرایط CO₂ ۵ درصد، رطوبت ۱۰۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون به هر چاهک ۱۰۰ μ l از محلول MTT اضافه گردید و مجدداً ظرف مورد نظر به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور CO

IBRC C10889	
Cell line name:	AD-MSC-02
Cell line type:	Human Adipose Derived Stem Cells
Accession Cell No:	IBRC C10889
Organism:	<i>Homo sapiens</i>
Breed:	Unknown
Summary:	Human abdominal subcutaneous adipose tissue was surgically obtained from a 30-year-old male, with Prior consent of the donor.
Morphology:	Fibroblast-like
Medium:	DMEM-F12 (1:1) medium + 20% Fetal Bovine Serum + 2mM L-Glutamine
Subculture:	Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:2 to 1:3 i.e. seeding at 2×10^4 cells/cm ² using 0.25% Trypsin, 0.02% EDTA
Incubation:	At 37°C with 5% CO ₂
Storage:	90%FBS + 10% DMSO at about 1×10^6 cells/vial
Mycoplasma:	Negative
Bacteria/fungi:	Negative
Inter species identification:	Confirmed as human by PCR method
Release condition:	General



شکل ۱. شناسنامه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که از بانک سلول‌های انسانی و جانوری مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شده است (A)، نتایج تأیید هویت این رده سلولی شامل بررسی مارکرهای سطحی به وسیله فلوسایتومتری (B)، پتانسیل تمایز به سلول‌های چربی و تأیید با رنگ آمیزی اوایل قرمز (C)، پتانسیل تمایز به سلول‌های استخوانی و تأیید با رنگ آمیزی آلزارین قرمز (D)

یافته‌ها

بررسی سلول‌ها از لحاظ ویژگی‌های رشد و مورفولوژی

پس از تهیه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از بانک سلولی مرکز ملی زیستی ایران، روزانه سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ اینورت مشاهده شد و تصاویر سلول‌ها ثبت گردید. این سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی دوکی شکل و چسبنده به سطح بودند (شکل ۲) و از سرعت تکثیر و رشد بالایی برخوردار بودند. به صورتی که لازم بود هر سه روز یک مرتبه محیط کشت این سلول‌ها تعویض گردد و هنگامی که به تراکم ۸۰ درصد رسیدند، پاساژ سلولی به نسبت ۱:۳ برای آن‌ها انجام می‌گرفت همچنین در این مرحله ظرف‌های کشت به صورت روزانه از لحاظ آلودگی باکتری و قارچی با میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند و در طول مدت کشت هیچگونه آلودگی مشاهده نگردید و سلول‌ها از لحاظ شرایط کشت در حد مطلوبی بودند.

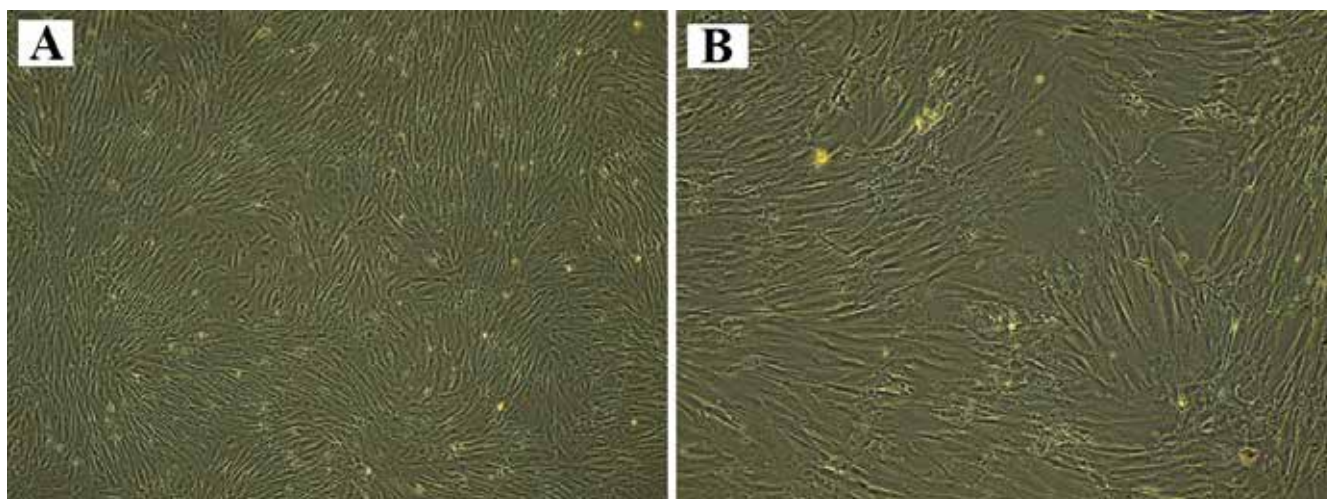
تعیین غلظت غیر سمی سیپروفلوکساسین به وسیله آزمایش MTT

به وسیله آزمایش MTT می‌توان سرعت تکثیر، کاهش سرعت تکثیر سلول‌ها و یا میزان مرگ و میر سلول‌ها را اندازه گرفت. یکی از نقاط قوت آزمایش MTT این است که در این روش تعداد مراحل کار برای افزایش سرعت آزمایش به حداقل رسیده است و به دلیل ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و سیگنال‌های ایجاد شده، اندازه‌گیری دقیق سرعت تکثیر سلولی

امکان‌پذیر است. نتایج تیمار سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین نشان داد که این ماده در غلظت‌های ۱/۵ تا ۱۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر، بر روی این سلول‌ها اثر سمی دارد و باعث مرگ سلولی می‌گردد. همچنین این ماده از غلظت ۰/۵ تا ۱۵۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر بر روی این سلول‌ها اثر سمی و کشنده ندارد (نمودار ۱ و شکل ۳). با این حال برای انجام این تحقیق، توجه به تحقیقاتی که بر روی سلول‌های بنیادی پالپ دندان صورت گرفته بود و همچنین بررسی مورفولوژی سلول‌ها در غلظت‌های غیر سمی، غلظت ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ سیپروفلوکساسین انتخاب گردید.

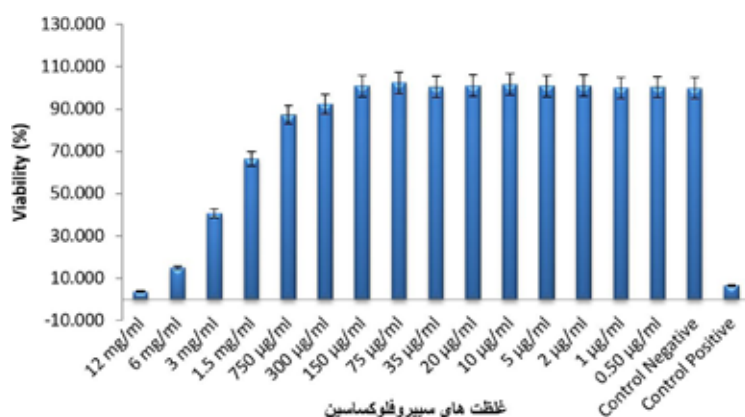
بحث و نتیجه‌گیری

امروزه، کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت‌های مختلف یکی از موضوعات جالب توجه در زمینه سلول درمانی و تحقیقات پزشکی است. این مسئله باعث گردیده است که محققان نگاه ویژه‌ای در ارتباط با جداسازی، کشت، تخلیص و به کارگیری این سلول‌ها در فرآیند درمان بیماری‌های خاص داشته باشند. از نظر منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت مغز استخوان به عنوان گسترده‌ترین بافت مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و مطالعات بالینی است، در حالی که بافت چربی به عنوان منبعی سهل الوصول و کم‌تهاجمی است که به وسیله روش‌هایی همچون



شکل ۲. تصویر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ x (A) و ۲۰۰ x (B)

کمپیلوباکتر، نایسریا و پسودوموناس مصرف می‌شود. این دارو دارای اثرات متوسط بر علیه باکتری‌های گرم مثبت شامل استرپتوکوکوس پنومونیه و استرپتوکوکوس فکالیز است. کاربرد اصلی سیپروفلوکساسین در درمان عفونت‌های تنفسی (به جز عفونت ناشی از استرپتوکوکوس پنومونیه)، عفونت مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه گوارش از جمله تب تیفوئید، سوزاک و سپتیسمی ناشی از میکروارگانیزم‌های حساس می‌باشد [۱۱]. همچنین سیپروفلوکساسین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک پروفیلاکسی برای پیشگیری از عفونت باکتریایی در بیمارانی که در مراحل سلول درمانی با پیوند سلول بنیادی قرار می‌گیرند، استفاده می‌شود. علاوه بر آن، این آنتی بیوتیک به طور گسترده‌ای در کشت سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی به منظور جلوگیری از آلودگی‌های باکتریایی از جمله مایکوپلاسما استفاده می‌شود [۱۲].



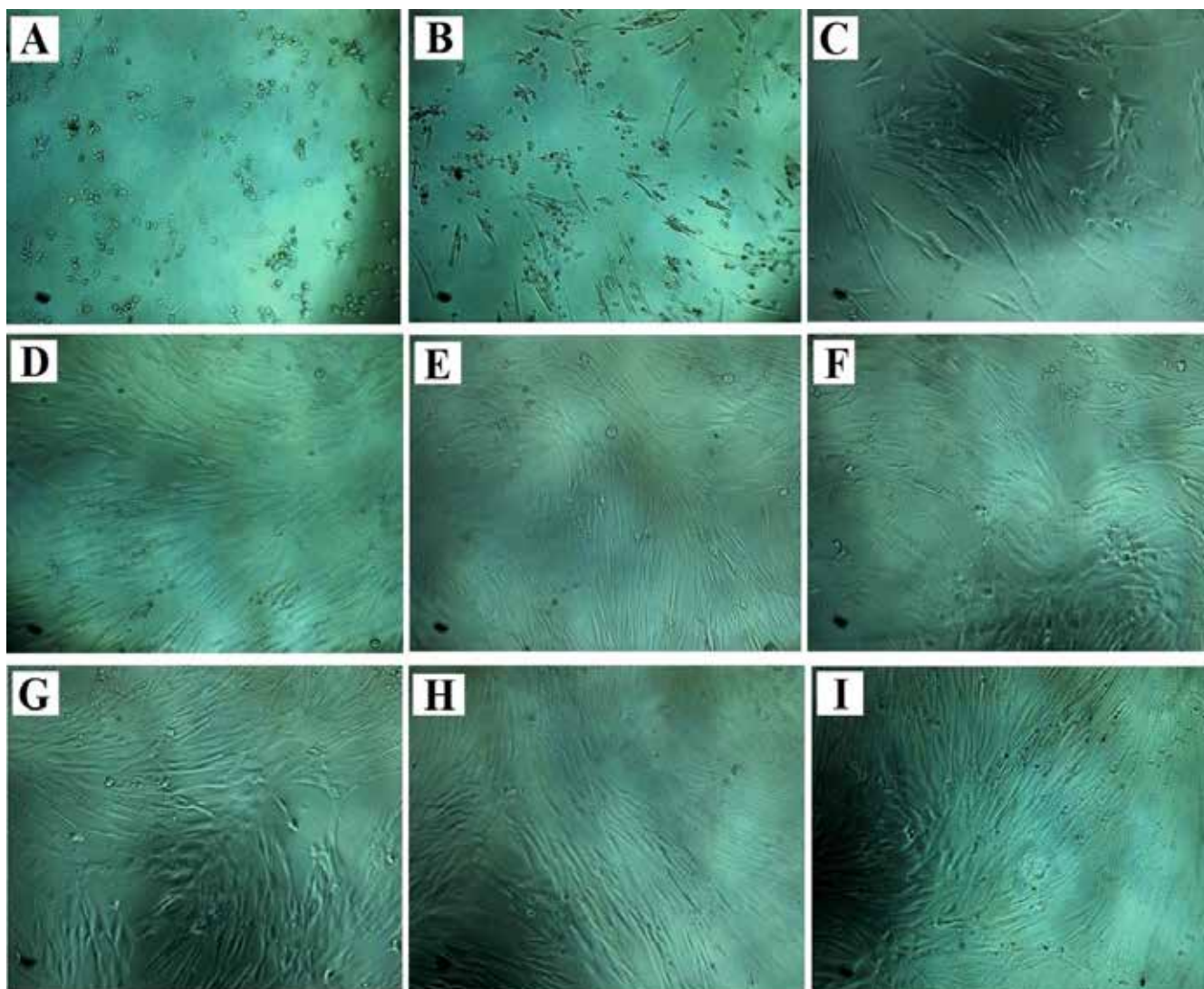
نمودار ۱. نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین بر روی بقاء سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به وسیله آزمایش MTT

جراحی و لیپوساکشن می‌توان آن را به دست آورد. همچنین مطالعات انجام شده نشان داده است که مقدار سلول‌های بنیادی به دست آمده از بافت چربی در مقایسه با بافت مغز استخوان در حجم یکسان، بسیار بیشتر است. بنابراین می‌توان این گونه استنباط کرد که در آینده‌ای نزدیک حجم استفاده و به کارگیری سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در تحقیقات زیستی و پزشکی افزایشی چشمگیر خواهد داشت [۷].

مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده است این سلول‌ها در طول روند کشت در شرایط آزمایشگاهی خصوصیات بنیادینگی ابتدایی خود را مانند توانایی تشکیل کلونی، ظرفیت تمایز و تکثیر خود از دست می‌دهند [۸]. بنابراین، حفظ خصوصیات بنیادینگی برای کاربردهای بالینی این سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی بسیار ضروری و حیاتی است. خصوصیات بنیادینگی سلول‌های بنیادی در داخل بدن به وسیله عوامل مختلفی همچون فاکتورهای رشد، تعاملات سلول-سلول و تعاملات ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌گردد. اما در شرایط آزمایشگاهی محققان بایستی در پی آن باشند که شرایطی را فراهم آورند تا به واسطه آن، تکثیر و حفظ خصوصیات اولیه سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی در طول روند کشت با کیفیت مطلوب انجام گیرد [۹]. لذا، حفظ خصوصیات بنیادین این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی، یکی از دغدغه‌های مهم و حیاتی در حوزه کشت سلول‌های بنیادی است [۱۰].

سیپروفلوکساسین^۱ از مشتقات فلوروکینولون‌ها^۲، یک ترکیب باکتریسید است که از طریق مهار آنزیم DNA ژیراز، همانندسازی، ترجمه و ترمیم DNA باکتری را مهار می‌کند. همچنین سیپروفلوکساسین در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی شامل سالمونلا، شیگلا،

1. Ciprofloxacin
2. fluoroquinolones



شکل ۳. تیمار سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین: (A) ۱۲ mg/ml, (B) ۶ mg/ml, (C) ۳ mg/ml, (D) ۱/۵ mg/ml, (E) ۳۰۰ µg/ml, (F) ۱۵۰ µg/ml, (G) ۷۵ µg/ml و (H) ۱۰ µg/ml (I)

چربی است که منبعی با دسترسی آسان، کم خطر و قابلیت استفاده در فرآیند سلول‌درمانی هستند [۱۳]. مطالعه حاضر با استفاده از این سلول‌ها که از لحاظ بیان مارکرهای سطحی، قابلیت تمایز و عدم آلودگی به میکروارگانیسم‌ها تأیید شده بودند، به عنوان یک مدل، نشان داد استفاده از سیپروفلوکساسین در طول دوره کشت با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر، می‌تواند باعث ایجاد شرایط مناسب کشت و حفظ قابلیت بنیادی این سلول‌ها در طول کشت گردد. لذا، با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق پیشنهاد می‌گردد، به منظور ایجاد شرایط بهینه در زمان کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، سیپروفلوکساسین با غلظت ذکر شده به محیط کشت سلول‌ها اضافه شود تا باعث ایجاد شرایط بهینه برای رشد این سلول‌ها گردد.

کراتیپایون و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که استفاده از سیپروفلوکساسین در محیط کشت سلول‌های بنیادی پاپیلای درم انسان می‌تواند باعث افزایش بنیادینگی سلول‌ها در طول کشت گردد. در این تحقیق این گونه بیان شده است که کلنی‌زایی و شاخص‌های بنیادی سلول‌های پاپیلای درمی در طول فرآیند کشت به تدریج و به صورت وابسته به زمان کاهش می‌یابد. با این حال تیمار سلول‌ها با غلظت غیر سمی سیپروفلوکساسین می‌تواند سبب حفظ مرفولوژی، کلنی‌زایی و مارکرهای سلول‌های بنیادی در آن‌ها شود.

یکی از دلایل انتخاب رده سلولی بنیادی مشتق از بافت چربی برای این تحقیق، ویژگی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت

References:

1. Mardones R, Jofré CM, Tobar L, Minguell JJ. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of hip osteoarthritis. *Journal of Hip Preservation Surgery*. 2017; 4(2): 159-63.
2. Ahmadbeigi N, Soleimani M, Vasei M, Gheisari Y, Mortazavi Y, Azadmanesh K, Omidkhoda A, Janzamin E, Nardi NB. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived cell components with hematopoietic stem cell niche. 2013; 22(23): 3052-61.
3. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *Journal of tissue engineerin*. 2015; 6(1-10).
4. Buehring GC, Eby EA, Eby MJ. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2004; 40(7): 211-5.
5. Aust L, Devlin B, Foster S, Halvorsen Y, Hicok K, Du Laney T, Sen A, Willingmyre G, Gimble J. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004; 6(1): 7-14.
6. Ganji M, Fazeli A, Gohari N, Rahmati H, Elyasi Z, Izadpanah M, Mohammadi S, Asadi M, Ashori S, Farzane p. Isolation, characterization and standard storage of human mesenchymal stem cell derived from adipose and dental pulp tissue. 2017; 24(157), 35-50.
7. Assoni AF, Coatti GC, Gomes JPA, Pelatti MV, Zatz M. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells, Working with Stem Cells. 2016; 37-55.
8. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer research*. 2007; 67(19): 9142-9.
9. Bara JJ, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem cells*, 2014; 32(7): 1713-23.
10. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*. 2007; 9(1): 204.
11. Gabanyi I, Lojudice F, Kossugue P, Rebelato E, Demasi M, Sogayar M. VP22 herpes simplex virus protein can transduce proteins into stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013; 46(2): 121-7.
12. Mowles J. The use of ciprofloxacin for the elimination of mycoplasma from naturally infected cell lines. *Cytotechnology*. 1988; 1(4): 355-8.
13. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. 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.