

عزل الخلايا الجذعية المتوسطة من نسيج الحبل السري وتتميطها وتمايزها

مجد الجمالي⁽¹⁾ و لمى يوسف⁽³⁾ و سعاد العقلة⁽⁴⁾

- ⁽¹⁾ قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.
⁽²⁾ قسم التقانات الحيوية الصيدلانية والمناعية، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية.
⁽³⁾ قسم الصيدلانيات والصيدلة الصناعية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.
⁽⁴⁾ قسم علم الحيوان، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

تاريخ الإيداع 2012/07/04

قبل للنشر في 2012/08/06

الملخص

شهدت العقود الماضية اهتماماً متزايداً بالخلايا الجذعية كمصدر لاستبدال الأنسجة التالفة والخلايا البشرية المفقودة فيزيولوجياً أو إمرضياً خلال حياة الفرد البالغ. وبدأ في سورية تأسيس بنوك لدماء الحبل السري وأُسجته، التي من المأمول أن تمنح الفرصة مستقبلاً لعزل الخلايا الجذعية المولدة للدم (HSCs) والخلايا الجذعية المتوسطة (MSCs) المكتنفة في هذه الأنسجة واستخدامها لأغراض علاجية. هدف هذا البحث إلى اختبار بروتوكولات لعزل خلايا جذعية متوسطة (MSCs) من أنسجة الحبل السري لمواليد سوريين، وتكثيرها في أوساط استنبات ملائمة، وتميطها، وتحريض تمايزها. عزلت خلايا جذعية متوسطة من عيني حبل سري لولادتين قيصريتين اعتماداً على خاصية التصاق هذه الخلايا بالسطوح، واستنبتت الخلايا المعزولة في وسط مغذٍ خاصٍ يسمح بنموها وتكاثرها. نمّطت الخلايا بتقنية الجريان الخلوي باستخدام أصداد وحيدة النسيلة مفلورة موجهة لواسمات سطحية نوعية بالخلايا الجذعية المتوسطة. جرى إمرار جزء من هذه الخلايا عدة مرات في وسط الاستنبات، وحفظ الجزء الآخر في الآزوت السائل، وقيمت عيوشية الخلايا بعد التجميد. جرى استقصاء قدرة هذه الخلايا على التمايز إلى خلايا شحمية في وسط استنبات يحتوي الإندوميتاسين والهيدروكورتيزون. تمكنا في هذا البحث من عزل خلايا جذعية متوسطة من عينتين لنسيج الحبل السري. أبدت هذه الخلايا خاصية الالتصاق على السطوح البلاستيكية، وأظهرت مرتسماً نوعياً من المستضدات السطحية (CD90⁺، CD105⁺، CD13⁺، CD117⁺، CD44⁺، CD34^{dim}). حرّض الإندوميتاسين والهيدروكورتيزون في وسط الاستنبات تمايز هذه الخلايا إلى خلايا شحمية، وترافق ذلك مع تغيير في الشكلية وظهور قطيرات من الدسم أبدت تلوّناً إيجابياً مع أحمر السودان. أمكن حفظ هذه الخلايا بالتجميد في الآزوت السائل مع المحافظة على عيوشية عالية بلغت وسطياً نسبة تقارب الـ 90%. إن هذا البحث، وبحسب معلوماتنا، هو الأول من نوعه في القطر لعزل خلايا جذعية متوسطة من نسيج الحبل السري، ومن المأمول أن يؤسس هذا العمل للمزيد من البحوث المستقبلية على الخلايا الجذعية بوصفه إحدى ركائز الطب التجديدي وعلاج العديد من الأمراض.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية متوسطة، الحبل السري، تتميط، تمايز.

Isolation, Phenotyping, and Differentiation of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UCMSCs)

M. Al-Jamali^{(1),(2)}; L. Youssef⁽³⁾ and S. Al-Okla⁽⁴⁾

⁽¹⁾Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Univ. Damascus, Syria.

⁽²⁾Department of Pharmaceutical Biotechnology and Immunology, National and commission for Biotechnology, Damascus, Syria.

⁽³⁾Department of Pharmaceutics and industrial pharmacy univ. Damascus, Syria.

⁽⁴⁾Department of Biology, Faculty of Sciences, Univ. Damascus, Syria.

Received 04/07/2012

Accepted 06/08/2012

ABSTRACT

The last decades witnessed an increasing interest in stem cells as an alternative source for injured tissues and lost cells either physiologically or morbidly during the adult's life. Today, few new umbilical cord (UC) blood and tissue banks have been established in Syria aiming at storing these tissues as a source for the future use of hematopoietic stem cells (HSCs) or mesenchymal stem cells (MSCs) found in the cord tissues. This research aims at establishing and testing protocols for isolation, *in vitro* proliferation, phenotyping, and differentiation of MSCs embedded in umbilical cord tissues of Syrian newborns.

MSCs were isolated from two caesarian births depending on their adherence characteristic on plastic surfaces, and cells were cultured in MSC medium for their growth and proliferation. Cell phenotyping was performed by flow cytometry using fluorescent monoclonal antibodies specific to MSCs' surface markers. Cultured cells were passed several times and a portion of these cells was cryopreserved in liquid nitrogen, and cell viability was assessed. Differentiation of these MSCs into adipocytes was conducted using culture medium Indomethacin and hydrocortisone.

In this study we were able to isolate MSCs from umbilical cord blood using standard protocols. These cells grew in culture as adherent cells and exhibited a profile of surface antigens (CD90⁺, CD105⁺, CD13⁺, CD117⁺, CD44⁺, CD34^{dim}) specific to MSCs. Indomethacin and hydrocortisone induced differentiation of cultured cells into adipocytes. Cell differentiation was accompanied by changes in cell morphology and emergence of lipid droplets that stained positively with Sudan Oil. Finally, MSCs were successfully cryopreserved in liquid nitrogen with average viability of approximately 90%. To the best of our knowledge, this work is the first of its kind in Syria in which MSCs were isolated from umbilical cord tissues. We are hopeful that this study will pave the way for future research centered on stem cells that constitutes one of the pillars for regenerative medicine and treatment of numerous diseases.

Key Words: Umbilical Cord, Mesenchymal Stem Cells, Phenotyping, Differentiation.

مقدمة

تمتاز الخلايا الجذعية عن السواد الأعظم من خلايا الجسم بكونها خلايا غير متميزة تمتلك كموناً potential استثنائياً لتتطور معطية العديد من الأنماط الخلوية المختلفة في أثناء المراحل المبكرة من حياة الكائن الحي ونموه، كما تقوم هذه الخلايا بدور المنظومة الداخلية لصيانة كثير من الأنسجة وإصلاحها. ونظراً إلى قدرتها الفائقة على الانقسام اللامتناهي، تعوض هذه الخلايا سدّ الفاقد من الخلايا طوال حياة الكائن الحي (الإنسان أو الحيوان). تكمن معظم الخلايا الجذعية في الطورين G0 أو G1 من أطوار الدارة الخلوية Cell Cycle⁽¹⁾، وتتسم بغض النظر عن مصدرها بثلاث خصائص فريدة عامّة هي: القدرة على الانقسام والتجدد الذاتي، وعدم التخصص أو "خاصية اللاتمايز"، والقدرة على إعطاء أنماط خلوية متخصصة عند تعرضها لعوامل تمايز سواء في الوسط الصناعي *in vitro* أو في الكائن الحي *in vivo*.

تتعدد أنماط الخلايا الجذعية تبعاً لمصدرها و/أو لقدرتها على التمايز. فمن حيث المصدر، تصنف الخلايا الجذعية إلى (i) خلايا جذعية جنينية Embryonic Stem Cells (ESCs)، منأية من الكتلة الخلوية الداخلية Inner Cell Mass (ICM) في الكيسية الأريمية Blastocyst للجنين، و(ii) خلايا جذعية بالغة توجد بصورة رئيسة في نقي العظم Bone Marrow Stem Cells (BMSCs) فضلاً عن أنسجة أخرى، وتكون مسؤولة عن تعويض الفاقد الفيزيولوجي أو المرضي من خلايا تلك الأنسجة، و(iii) خلايا دم الحبل السري ونسيجه Umbilical Cord Stem Cells (UCSCs). تشمل خلايا الحبل السري دورها نوعين أساسيين من الخلايا، هما: الخلايا الجذعية المولدة للدم Hematopoietic Stem Cells (HSCs)، والخلايا الجذعية المتوسطة Mesenchymal Stem Cells (MSCs) المسماة أيضاً بالخلايا الميزنشيمية أو السدوية Stromal. تشترك خلايا UCSCs في معظم خصائصها - وإلى حد بعيد - مع الخلايا الجذعية البالغة، على الرغم من وجود نسبة ضئيلة منها تصنف كخلايا مشابهة للخلايا الجذعية الجنينية. أمّا من حيث القدرة على التمايز، فتتسم الخلايا الجذعية الجنينية بكونها كثيرة القدرات Pluripotent، في حين تعدّ الخلايا الجذعية البالغة خلايا متعددة القدرات Multipotent تكون قادرة على التمايز إلى أنماط محدودة من الأنسجة. وعلى الرغم من محدودية الخلايا الجذعية المتوسطة MSCs في قدراتها التمايزية، فإنّ استخدامها ليس مقيداً بالقواعد الأخلاقية الصارمة التي تحكم الخلايا الجذعية الجنينية. كما تمتاز هذه الخلايا بسهولة عزلها في الوسط الصناعي *in vitro* نظراً إلى التصاقها بسطوح أوعية الاستتبات البلاستيكية، وقدرتها على التمايز إلى خلايا غضروفية وعظمية وشحمية، فضلاً عن تأثيراتها المثبطة للمناعة في الكائن الحي، ممّا جعل منها محط أنظار العديد من الفرق البحثية⁽²⁻⁴⁾.

للخلايا الجذعية المتوسطة MSCs مصدران رئيسان هما نقي العظم ودم الحبل السري أو نسيجه. وعلى الرغم من أن الدراسات الحديثة قد بيّنت أن الخلايا الجذعية البالغة الجوّالة Circulating في دم الحبل السري هي أندر من مثيلاتها في نقي العظام (0.0001% بمقابل 0.001-0.01% من مجموع الخلايا وحيدة النواة في النسيجين على الترتيب)، إلا أن استجابتها لعوامل النمو ومحرّضات الانقسام أكبر مقارنة بالخلايا البالغة المتوضعة في نقي العظام (5-8). فضلاً عن ذلك، تُعد خلايا دم الحبل السري أقلّ نضجاً من خلايا نقي العظام بالنسبة إلى فعلها المحرض للمناعة، ومن ثمّ تُعدّ مفضّلة لدى الزرع الغيري للخلايا الجذعية Stem Cell Allo-Transplantation (8). وأخيراً، فإن سهولة الحصول على عينة الحبل السري بعد الولادة تكسبها أفضلية بيّنة مقارنة ببزل نقي العظم الباضع Invasive المتطلب للتخدير لدى إجرائه. غير أنّ عزل الخلايا الجذعية المتوسطة من نسيج الحبل السري عملية متطلّبة للجهد والوقت لفصل الخلايا عن محيطها المكوّن من ألياف الكولاجين والسكريات البروتينية (9).

يحتوي نسيج الحبل السري على هلامية وارتون Wharton's Jelly (WJ)، وهي عبارة عن نسيج ضام شبه مخاطي يحيط بكل من وريد الحبل السري وشريانيّه. وتتشأ الهلامية من الأديم المتوسط Mesoderm خارج الجنين في اليوم الثالث عشر من تطور الجنين (10). يتألّف نسيج WJ من خلايا سدوية Stromal شبيهة بالأرومات الليفيّة العضلية Myofibroblasts ومن ألياف الكولاجين وسكريات بروتينية Proteoglycans أو حمض الهيالوروني الذي يشكّل هلامية تحيط بالأرومات الليفيّة وألياف الكولاجين لتحمي بذلك أوعية الحبل السري من الضغط المطبق عليها (11). وقد أُشير حديثاً إلى أن الخلايا غير الناضجة المحتفظة بالقدرة على التكاثر تقع قريباً من السطح المشيمي، بينما تتوضّع الأرومات الليفيّة المتمايّزة، والمسماة بالخلايا تحت الوعائية Perivascular Cells (PVCs) بشكل أقرب إلى أوعية الحبل السري، وهو ما يتفق مع وجود نمطين رئيسيين للخلايا السدوية المعزولة من نسيج الحبل السري؛ تبدي الخلايا من النمط الأول شكلاً مكعباً وهي كبيرة الحجم مقارنة بخلايا النمط الثاني الأقرب إلى الشكل المغزلي (10).

تشمل تطبيقات الخلايا الجذعية المتوسطة الطب التجديدي Regenerative Medicine، وتتضمن لائحة المُستفيدين شرائح واسعة جداً من المرضى بما في ذلك مرضى الكسور والجروح وأذيات النخاع الشوكي والدماغ وعضلة القلب وداء باركنسون والسكري من النمط الأول وأنماطاً من أذيات القرنية (12). ومن هنا تنبثق أهمية حفظ الخلايا الجذعية من دم الحبل السري ونسيجه في بنوك متخصصة وتطوير أو تبني برتوكولات لاستنبات هذه الخلايا وتكاثرها وتمييزها والإفادة منها لاحقاً.

تتسم الخلايا الجذعية المتوسطة بانخفاض قدرتها الاستمناعية immunogenic أو حتى انعدامها، ممّا يزيد من فرص نجاح اغتراسها لدى المتلقي. كما ينسب إلى هذه الخلايا

إفرازها للعديد من السيتوكينات المثبطة للمناعة خلوية الوساطة، وتجرى البحوث حالياً على مستوى التجارب السريرية لتقييم قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة في التقليل من رد الفعل المناعي تجاه الغرسات النسيجية لدى نقل الأعضاء^(13، 14). على صعيد آخر، برزت حديثاً أهمية الخلايا الجذعية في اكتشاف الصناعات الدوائية وتطويرها، إذ يمكن الاستفادة من التمايز الموجه للخلايا الجذعية في إنتاج جمهرة من خلايا نسيج معين، أو حتى نسيج متكامل، بما يمكن من اختبار مواد دوائية جديدة أو مشاركات دوائية جديدة^(15، 16)، ومن ثم الحصول على نموذج أكثر مقارنة للخلايا البشرية ضمن النسيج الحي. تتمتع المقاييس التي تجري في مثل هذه الأنسجة بالكرارية المطلوبة التي قد تظهر الأهمية الإحصائية لتأثير الدواء تحت الاختبار، فضلاً عن إمكانية محاكاة توزع الدواء ضمن النسيج.

هَدَفَ بحثنا الحالي إلى اختبار إمكانية عزل الخلايا المتوسطة من نسيج الحبل السري وتمييز هذه الخلايا اعتماداً على مستضداتها السطحية بواسطة تقنية الجريان الخلوي، وتحريض تمايزها إلى خلايا شحمية في الشروط الملائمة، كما يؤسّس لتمييز وتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة المعزولة من نسيج الحبل السري تحضيراً للتطبيقات المستقبلية العديدة للخلايا الجذعية في الطب التجديدي ولاسيما أن سورية تشهد اليوم انطلاقة لتأسيس بنوك دم ونسيج الحبل السري في عدد من المؤسسات الوطنية.

مواد البحث وطرقه

المواد والتجهيزات

اشترت أوساط الاستنبات الخلوي بما في ذلك Dublicco's Modified Eagle Medium (DMEM) منخفض تركيز الجلوكوز، ووسط (IMDM)، والمصل البقري الجنيني (FBS) Fetal Bovine Serum، ودارئة الفوسفات الملحية Phosphate Buffered Saline (PBS)، وإنزيمي التربيسين (Trypsin 0.05%) والكولاجيناز (Collagenase I, 10X)، والصادات الحيوية Penicillin و Streptomycin، والغلوتامين، ووسط الاستنبات الخاص بالخلايا الجذعية المتوسطة Mesencult من شركة Stem Cell Technologies الكندية، وتم الحصول على المضاد الفطري Amphotericin من شركة (Euroclone) الإيطالية، ومادتي الفورمالين وأحمر السودان من شركة Sigma الأمريكية، والأضداد النوعية وحيدة النسيلة من النمط IgG1 المستعملة لوسم الخلايا في تجارب الجريان الخلوي - conjugated anti-FITC-IgG1 و anti-PE-IgG1 من شركة Serotec الإنكليزية، في حين جرى الحصول على أضداد FITC-anti-CD117، و FITC anti-CD105، و PE-anti-CD105، والأضداد الشاهدة FITC-IgG1 و PE-IgG1 من شركة Serotec الإنكليزية، في حين جرى الحصول على أضداد PE-anti-CD34 و FITC-anti-CD90 و FITC-anti-CD13 من شركة Becton Dickinson (BD) الأمريكية. حصلنا على DMSO من شركة PAN

الألمانية، وأطباق وفلاسكات الزرع الخلوي من شركة SPL Scientific الكورية. عُدت الخلايا باستعمال عدادة نيويار الخلوية بوجود أزرق التريبان لتقييم العيوشية. أجريت تجارب الجريان الخلوي بجهاز FACS Calibure من شركة Becton Dickinson (BD) الأمريكية، وحللت البيانات باستخدام برمجية CellQuest. دُرست الخلايا بالمجهر المقلوب من شركة Olympus وباستخدام كاميرا توثيق خاصة.

عزل الخلايا الجذعية

أخذت خمس عينات من الحبل السري لثلاث ولادات طبيعية وولادتين قيصريتين التي تمت جميعها في مستشفى التوليد الجامعي في جامعة دمشق بعد الحصول على الموافقة المستتيرة من النساء الحوامل وإغفال معلوماتهن الشخصية. من الجدير بالذكر أننا قمنا باستبعاد عينات الولادات الطبيعية كافة في مرحلة لاحقة في أثناء استنبات الخلايا نظراً إلى التلوث الجرثومي المرافق، واقتصرت التجارب الناجحة على عيني الحبل السري من الولادتين القيصريتين.

نقلت قطع الحبل السري بطول ~ 20 سم ضمن وسط DMEM يحتوي على البنسيلين والستربتومايسين والأمفوتريسين والغلوتامين بتراكيز عيارية، وغسلت مرات عدة بدارنة ملحية فوسفاتية (PBS)، وحقن هذا المحلول ضمن نسيج الحبل عدة مرات للتخلص من بقايا الخثرات المتشكلة خلال الاعتيان. جُرئت قطع الحبل السري إثر ذلك إلى قطع بأبعاد لا تتجاوز 1 سم، ووزعت في أبار طبق استنبات ذي 12 بئراً وحضنت في وسط الاستنبات DMEM الخالي من المصل والحاوي على (10%) من إنزيم الكولاجيناز Collagenase I 1. وحضنت العينات (قرابة 18 ساعة) في هذا الوسط، وفي نهاية مدة الحضنة مع الكولاجيناز، جُمع السائل الطافي من الأبار وجمعت الخلايا المتحررة من نسيج الحبل السري بالنبذ بسرعة 1200 دورة/دقيقة مدة 5 دقائق، وبعثرت في وسط DMEM الحاوي على 20% من المصل FBS، وحضنت الخلايا في هذا الوسط مدة 48 ساعة. لاحقاً لذلك، أزيلت الخلايا غير الملتصقة واستبدل وسط DMEM/20% FBS بوسط الاستنبات الخاص (Mesencult MSCs) والحاوي على السيتوكينات اللازمة لنمو الخلايا الجذعية المتوسطة وتكاثرها. بُدّل الوسط Mesencult كل ثلاثة إلى أربعة أيام، إلى حين وصول الخلايا إلى حدّ التماذي confluence المقارب لنسبة 80-90%، حيث نزلت الخلايا الملتصقة بمعاملتها بإنزيم التريسين (0.05%) مدة 5 دقائق بدرجة حرارة 37°م. أضيف بعد ذلك وسط DMEM الحاوي على 10% من المصل لتثبط إنزيم التريسين، ومن ثم نبذت الخلايا بسرعة 1200 دورة/د وأعيدت بعثرتها ضمن وسط Mesencult، ومن ثم نقلت إلى وعاء T25 Flask وحضنت في الوسط ذاته، وكررت هذه الإجراءات في الإمرارات اللاحقة للخلايا.

حفظ الخلايا بالتجميد

أضيف إنزيم التربسين (0.05%) إلى الخلايا الملتصقة مدة 5 دقائق، وبعثرت الخلايا المنفصلة عن السطوح البلاستيكية في وسط DMEM/10% FBS، ومن ثم نبذت الخلايا بسرعة 1200 دورة/د بدرجة حرارة الغرفة مدة 5 دقائق. بعثرت الخلايا في وسط DMEM/10% FBS جديد بدرجة حرارة 4 درجة مئوية، وأضيفت إليها كميات متساوية من وسط DMEM/10% FBS الحاوي على 20% من DMSO. وزعت الخلايا في أوعية خاصة بتجميد الخلايا Cryo-Vials، وحفظت ضمن صندوق يحتوي على الإيزوبروبانول في مجمدة بدرجة حرارة -80 م مدة 24 ساعة، ونقلت بعدها الخلايا إلى صناديق الحفظ في الأوت السائل. لفك تجميد الخلايا، أخرجت الخلايا من حاوية الأوت السائل ووضعت مباشرة في حمام مائي بدرجة 37°م، وقيمت عيوشية الخلايا بتلويين الخلايا بأزرق التريبيان. وزعت الخلايا المعدة للزرع في وسط DMEM/10% FBS وبعد النبذ، أعيدت بعثرة الخلايا في وسط Mesencult بالطريقة الموصوفة أعلاه.

تنميط الخلايا بالجريان الخلوي

أضيف إنزيم التربسين (0.05%) إلى الخلايا الملتصقة، ومن ثم بعثرت الخلايا ضمن وسط DMEM/10% FBS، وصولاً إلى تفردها (أي بعثرتها كخلايا مفردة والتحقق من ذلك مجهرياً). بعد العد، وزعت الخلايا في الأنابيب المخصصة للجريان الخلوي (2×10^5 /الأنبوب)، وغسلت بدارئة PBS مزودة بـ 2% EDTA + FBS، وبعثرت الخلايا في 100 مكل من الوقاء، وحضنت مع الأضداد على الثلج مدة نصف ساعة في الظلام، وأزيل الفائض من الأضداد غير المرتبطة بالغسل بـ 3 مل من الوقاء. تم تحري تعبير الخلايا عن معقدات التمايز السطحي Clusters of Differentiation التي شملت كلا من الـ CD44 و CD117 و CD105 و CD90 و CD34 و CD13 مقارنة بأضداد شاهدة سلبية وذلك بإمرار الخلايا أولاً عبر بوابة منطقتي الانتثار الأمامي والجانبى forward and side scatter areas (FSC & SSC) في جهاز التدفق الخلوي، ومن ثم أجري تحليل أحادي اللون أو ثنائي اللون.

تمايز الخلايا

بُنرت الخلايا بتركيز (2.5 X 10³/بئر) في طبق استنبات خلوي يحتوي 96 بئراً. بعد مضي 24 ساعة، غسلت الخلايا في كل بئر بدارئة PBS ثم أضيف الوسط المحرض لتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا شحمية {FBS 5% IMDM/الحاوي على الإندوميتاسين (0.1 ميللي مول/ل) والهيدروكورتيزون (1 ميكرومول/ل) في الإيثانول، وفق بروتوكول موصوف سابقاً⁽¹⁷⁾ مع بعض التعديلات، وأضيفت حجوم مكافئة من الإيثانول إلى الأبار الشاهدة. دامت مدة حضن الخلايا في وسط الاستنبات المحرض على التمايز أسبوعين دون تغيير الوسط وجرى خلالهما مراقبة شكلياء الخلايا مجهرياً. في

اليوم الخامس عشر، قمنا بتلوين الخلايا بأحمر السودان، حيث غسلت الخلايا بدائرة PBS مرتين، ثم أضيف حجم قدره 100 مكل من محلول الفورمالين إلى كل بئر وجرى تثبيت الخلايا مدة ساعة كاملة داخل خيمة العزل. في الخطوة التالية، غسلت الخلايا عدة مرات بالماء المقطر، وأضيف 100 مكل من الإيزوبروبانول بتركيز 60%، وحضنت الخلايا مدة 5 دقائق. بعد إزالة الإيزوبروبانول، أضيف 100 مكل من محلول أحمر السودان في مزيج من الإيزوبروبانول والماء (بنسبة 2:3)، وحضنت الخلايا مدة 5 دقائق ثم إثرها إزالة أحمر السودان بغسل الخلايا بالماء المقطر بلطف حتى الحصول على غسل خال من اللون الأحمر، وجرى أخيراً توثيق وجود قطيرات الزيت التي أبدت تلويناً إيجابياً بأحمر السودان في الخلايا المتميزة باستخدام المجهر المقلوب المجهز بكاميرا رقمية.

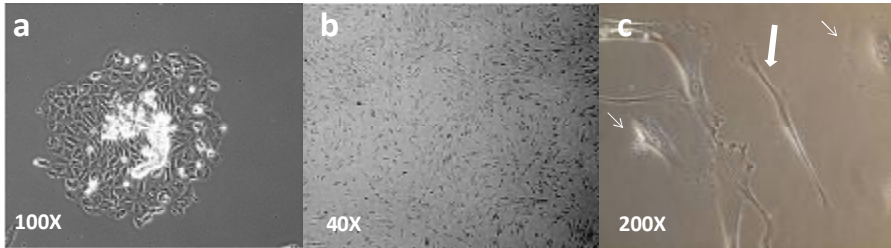
النتائج والمناقشة

وضعت لجنة الخلايا الجذعية المتوسطة والنسجية المنبثقة عن الجمعية العالمية للمعالجة الخلوية (International Society for Cellular Therapy (ISCT) متطلبات ثلاثة كحدٍ أدنى لتعريف الخلايا الجذعية المتوسطة، وتشمل هذه المعايير قدرة الخلايا على الالتصاق بالسطوح البلاستيكية في شروط الاستنبات في الوسط الصنعي بوجود المصل؛ وإيجابية تعبيرها عن المستضدات (CD105، CD73، CD90) المميزة للخلايا الجذعية المتوسطة، وفي الآن ذاته سلبية (أو ضعف) تعبيرها عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم مثل CD34؛ وأخيراً، قدرتها على التمايز إلى خلايا عظمية أو شحمية أو غضروفية كنتيجة لتحريضها بعوامل نمو/مواد كيميائية خاصة^(18، 19). وبناءً على هذه المتطلبات، قمنا في هذه الدراسة بإجراء مجموعة من التجارب التي تختبر توافر الخصائص المميزة لخلايا الـ MSCs في الخلايا التي قمنا بعزلها من عينتي الحبل السري.

أظهرت نتائج دراستنا، بعد سيرنا لعدد من البروتوكولات المنشورة في الدوريات العلمية التخصصية، تمكننا من التوصل إلى بروتوكول تطبيقي بسيط لعزل الخلايا المتصلة من نسيج الحبل السري. اتسمت عينات الحبل السري المأخوذة من الولادات الطبيعية جميعها (3/3) بتلوينها جرثومياً، رغم شروط النقل الصارمة لتلك العينات التي تضمنت وسط استنبات عقيماً احتوى المضادات الحيوية الملائمة، وهو الأمر الذي أشار إلى إمكانية تلوين الحبل السري في أثناء الولادة، وحتماً في الآن ذاته التخلص منها لعدم قابليتها للاستنبات الخلوي في شروط عقيمة. في حين لم تبدِ أي من عينتي الحبل السري المأخوذتين من ولادتين قيصريتين أي تلوين.

غسل الحبل السري بشكل متكرر بدائرة الـ PBS للتخلص -قدر الإمكان- من بقايا الخثرات المتبقية في أوعية الحبل السري ومن كريات الدم الحمر والبيض المرافقة.

عولجت قطع الحبل السري بإنزيم الكولاجيناز I وجمعت الخلايا المتحررة من نسيج الحبل السري بالتنبيذ، ثم حُصنت في وسط الاستنبات مدة أربعة أيام، وسميت هذه المرحلة بالإمرار 0 (P0) Passage 0، إذ شكلت بعض تلك الخلايا في ختامها نَسائل صغيرة أو متوسطة الحجم (الشكل a.1). نزلت الخلايا عن السطح البلاستيكي أنزيمياً بفعل إنزيم التريبسين، ومن ثمّ بعثرت الخلايا جيداً في وسط الاستنبات ونقلت إلى فلاسك لتشكل ما أسميناه خلايا الإمرار الأول (P1). لدى وصول الخلايا إلى ما دون التماذي الأعظمي (~80-90%) (الشكل b.1)، أعيدت الخطوات السابقة باستعمال إنزيم التريبسين وبعثرت الخلايا للحصول على الإمرارات المتتابعة (من P2 إلى P10 حتى تاريخه). من الجدير بالذكر أنه وفي كلتا العزلتين، مرّت خلايا الإمرار الأول (P1) بطور تلكؤ Lag Phase بدئي استمر قرابة الأسبوع، واتسم نمو الخلايا خلاله بالبطء الشديد رغم توافر عوامل النمو التي يؤمنها وسط الاستنبات Mesencult المخصّص لتكاثر الخلايا المتوسطة، وهو ما يتوافق مع ما نشر سابقاً عن وجود زمن تلكؤ Lag Time يراوح بين 4-7 أيام قبل بدء الخلايا الجذعية بالانقسام المتتابع^(7,10). في اليوم العاشر للزرع، لوحظ بدء انقسام الخلايا بشكل متسارع، بحيث بلغ زمن التضاعف Doubling Time قرابة 4-5 أيام، مع تجديد الوسط كل 3-4 أيام، وكان زمن التضاعف مماثلاً في الإمرارات الأخرى.



الشكل (1) الخلايا الجذعية المتوسطة في الزجاج: a. نسيطة من الخلايا الأولية المعزولة من هلامة وارتون (تكبير X100)، b. MSCs المزروعة في الزجاج (تكبير X40)، c. نمطان مختلفان للخلايا الجذعية المتوسطة يشير إليهما السهمان المختلفان، حيث تبدو خلية مغزلية الشكل (السهم الكبير) وخلية مكعبة الشكل (السهم الصغير) (تكبير X200).

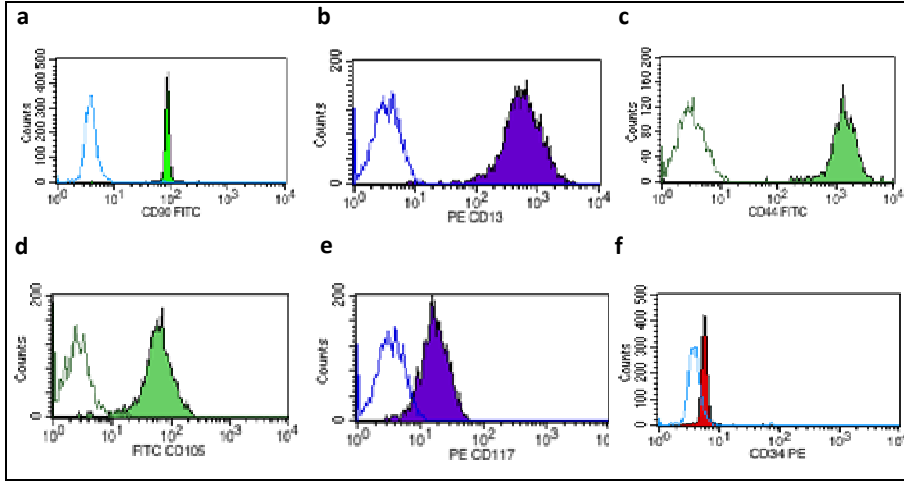
حُفظت الخلايا المعزولة بالتجميد ضمن الأزوت السائل، -196م، باتتبع البروتوكول المشروح أعلاه (الطرق methods)، وجرت مقايسة عيوشية الخلايا Cell Viability بالاعتماد على إقصاء أزرق التريبان في الخلايا الحية. اختبرت عيوشية الخلايا بعد تجميدها وإعادة فك التجميد، وبلغ متوسط عيوشية الخلايا نسبة تقارب الـ 90%، وهي نسبة مرتفعة وملائمة للتطبيقات المختلفة. من جهة أخرى، لم يلاحظ وجود أي فارق في

شكليات الخلايا بعد التجميد مقارنة بالخلايا التي استمر إمرارها لاحقاً الذي وصل إلى الإمرار العاشر حتى زمن كتابة هذا التقرير. وسنستمر لاحقاً بإمرار جزء من هذه الخلايا لتحديد العدد الأقصى للإمرارات التي يمكن لهذه الخلايا أن تجتازها مع المحافظة على خصائصها المورفولوجية وتعبيرها عن المستضدات السطحية وقدرتها على التمايز، مع الإشارة إلى أن تقارير سابقة درست تكاثر الخلايا الجذعية المتوسطة في الوسط الصناعي كانت قد اقترحت عدد إمرارات تراوح بين 30 إلى 50 إمراراً للخلايا، سواءً تلك المعزولة من الحبل السري أم من نقي العظم^(5,7).

يمكن أحد أهم التحديات التي تواجه الباحثين في حقل الخلايا الجذعية المتوسطة في عدم تجانس محضرات هذه الخلايا، وقد أشارت العديد من الدراسات إلى وجود أنماط عدة لهذه الخلايا التي تختلف عن بعضها بعضاً مورفولوجياً وفي مستوى تعبيرها عن بعض المستضدات السطحية. في سياق دراستنا، استعنا من الناحية المورفولوجية التمييز بسهولة بين نمطين من الخلايا ضمن شروط الزرع في الوسط الصناعي؛ بينما بدأ النمط الأول مفلطحاً وكبير الحجم بدأ النمط الثاني مغزلياً وأصغر مقارنة بالنمط الأول (الشكل 1.c). تتوافق هذه النتيجة مع ما أشير إليه سابقاً من أن للخلايا المتوسطة المعزولة من الحبل السري نمطين شائعين يختلفان في شكليات الخلايا، وربما وظيفتها. يمثل النمط الأول الخلايا الواقعة مباشرة تحت أوعية الحبل السري التي تسمى الخلايا تحت الوعائية PVCs، وهي خلايا مسطحة وشبيهة بالمكعب Cuboidal وذات نمو بطيء مقارنة بالنمط الثاني الذي يبدو كخلايا مغزلية الشكل أصغر حجماً وأسرع تكاثراً وأعلى تعبيراً عن المستضدات السطحية المميزة للخلايا الجذعية المتوسطة^(7,10,20). والجدير بالذكر أن إحدى الدراسات قد ذكرت وجود نمط ثالث صغير جداً من الخلايا الجذعية السدوية المعزولة من نسيج الحبل السري يتسم بسرعة تكاثره وبنسبة النواة إلى السيتوبلازما عالية⁽⁹⁾. يمكن الفارق في سرعة تكاثر الأنماط المختلفة للخلايا من حدوث تغيرات في نسبة هذه الخلايا إلى بعضها بعضاً مع زيادة عدد الإمرارات الخلوية، وربما من تحول الخلايا الجذعية المتوسطة من جمهرة متباينة الأنماط في الإمرارات البدئية للخلايا والتالية مباشرة للعزل إلى خلايا متجانسة في الإمرارات اللاحقة، وهو ما يستوجب اختبار ذلك عملياً ومقارنة مورفولوجيا الخلايا من إمرارات مختلفة وشدة التعبير عن مستضداتها السطحية، وربما اختلاف قدراتها على التمايز.

أظهرت نتائج التتميط بالجريان الخلوي إيجابية الخلايا المعزولة للمستضدات السطحية المميزة للخلايا الجذعية المتوسطة التي تشمل CD90، CD105، CD13، CD117، CD44، في حين كان التعبير سلبياً أو أصغرياً عن المستضد السطحي CD34 المميز للخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs (الشكل 2). تدل هذه النتائج على مستوى منخفض جداً من الإيجابية التي أبدتها الخلايا الملتصقة لـ CD34، وهذا ما دفعنا إلى تعريفها على

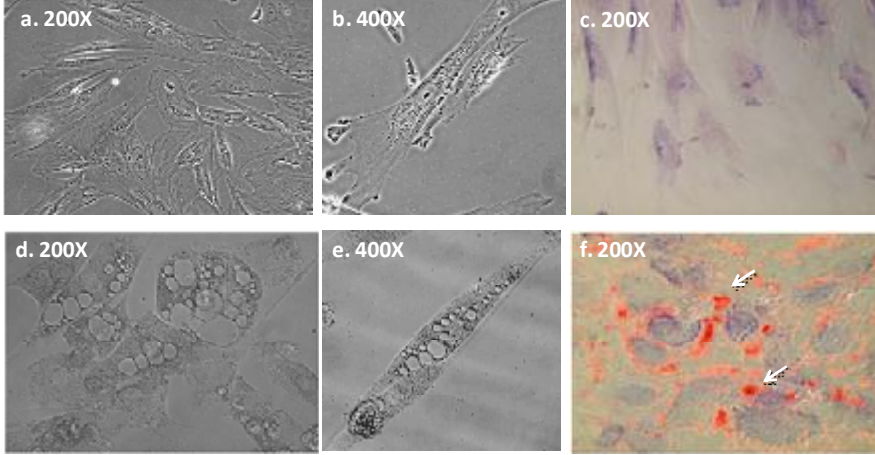
أنها $CD34^{dim/neg}$ ، إذ لم تتجاوز نسبة الخلايا إيجابية المستضد $CD34$ في تجاربنا الـ 1% من جهة أخرى، أظهر تحليل نتائج الجريان الخلوي تعبيراً قوياً عن المستضد السطحي $CD44$ مقارنة بالمستضدات الأخرى المميزة للخلايا الجذعية المتوسطة $CD105$ و $CD117$ ، وتتوافق هذه النتيجة مع معظم الدراسات الأخرى التي تدل جميعاً على أهمية التعبير عن $CD44$ على سطح الخلايا الجذعية المتوسطة نظراً إلى الدور المهم الذي يؤديه هذا البروتين السكري glycoprotein في هجرة الخلايا والتصاقها، وتأثرها مع الخلايا المجاورة ومع المطرس خارج الخلوي ECM^(8, 21, 22).



الشكل (2) مرسم المستضدات السطحية المميز للخلايا الجذعية المتوسطة، وهو كما يبدو في الأشكال (المنحنيات الممتلئة) (f-a): $CD90^+$, $CD13^+$, $CD44^+$, $CD105^+$, $CD117^+$, $CD34^{-/dim}$ ، وذلك مقارنة بالأضداد الشاهدة (المنحنيات الفارغة).

تمتلك الخلايا الجذعية المتوسطة المعزولة من الحبل السري كموناً للتمايز إلى ثلاثة أنماط رئيسية من الخلايا؛ الغضروفية، والشحمية، والعظمية⁽¹⁸⁾. كما أشارت العديد من التقارير الحديثة إلى إمكانية تمايز هذه الخلايا إلى خلايا عضلية وعصبية⁽²²⁻²⁷⁾. ويهدف اختبار قدرة الخلايا التي قمنا بعزلها من نسيج الحبل السري على التمايز إلى أنماط خلوية أخرى، اتبعنا بروتوكولا ملائماً معدلاً لتحريض تمايز الخلايا المتوسطة إلى خلايا شحمية؛ وذلك باستخدام الإندوميثاسين (0.1 ميلي مول/ل) والهيدروكورتيزون (1 ميكرو مول/ل) في وسط IMDM الحاوي على 5% من FBS⁽¹¹⁾. أظهرت النتائج تغيراً في شكلية الخلايا المحرّضة بوسط التمايز وزيادة في أحجامها مقارنة بالخلايا الشاهدة التي

حافظت على شكلها طيلة مدة الإستنبات في شروط التجربة (الأشكال 3 a، b، c، d، e). وفي حين كان جلياً اكتتاف معظم الخلايا المتميزة لقطيرات دسمة بحجوم مختلفة أبدت تلوينا إيجابياً لدى استخدام أحمر السودان (الشكل f3)، لم تشاهد قطيرات دسمة ذات تلوين إيجابي بأحمر السودان ضمن الخلايا الشاهدة التي استنتجت بوجود الإيثانول فقط (الشكل c3). تدعم هذه النتائج تمكننا من تحريض تمايز الخلايا الجذعية المعزولة في مختبرنا إلى خلايا شحمية تكتنف قطيرات من الدسم مخترنة ضمن حويصلات.



الشكل (3) تمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا شحمية. a. خلايا MSCs شاهدة و d. خلايا MSCs محرّضة على التمايز إلى خلايا شحمية (تكبير X200). b. خلايا MSCs شاهدة و e. خلايا MSCs محرّضة على التمايز إلى خلايا شحمية (تكبير X400). c. خلايا MSCs شاهدة و f. خلايا MSCs محرّضة على التمايز إلى خلايا شحمية (تكبير X200) بعد تلوين الخلايا بمحلولي غيمزا وأحمر السودان (تشير الأسهم إلى مواضع قطيرات الدسم المتلوّنة بأحمر السودان).

تبيّن النتائج السابقة بكتيّتها وبقوة امتلاك الخلايا المعزولة في مختبرنا جميع الصفات المميّزة للخلايا الجذعية المستنبّطة في وسط صناعي *in vitro*، سواءً من حيث التصاقها على السطوح، أم امتلاكها للمستضدات السطحية المميزة لـ MSCs، أم قدرتها على التمايز في الزجاج إلى خلايا شحمية بوجود مواد كيميائية محرّضة على التمايز. تعدّ هذه النتائج جدّ مشجعة للشروع في تحريض تمايز الخلايا الجذعية المتوسطة المعزولة إلى أنماط خلوية أخرى باستخدام محرّضات نوعية، واختبار إمكانية الإفادة من الخلايا المتميزة في المعالجات الخلوية المستقبلية. ولكن لا بدّ من الإشارة إلى أنّ خصائص

الخلايا الجذعية المتوسطة وتمايزها في الزجاج قد لا يعكس بدقة خصائصها داخل الكائن الحيّ *in vivo*، وعلى الأخصّ إذا ما أخذنا بالحسبان عوامل البيئة الميكروية/الصغرية في الحي التي قد تؤثر في تكاثر هذه الخلايا وتمايزها بما في ذلك إفراز السيبتوكينات وعوامل النمو التي تتعرض لها هذه الخلايا ضمن النسيج الذي تقطنه⁽²⁾. فضلاً عن ذلك، فإن من غير المعروف حتى الآن أفضّل تحريض الخلايا الجذعية على التمايز في الزجاج قبل نقلها إلى داخل العضوية كإحدى طرائق الطب التجديدي، أم نقل هذه الخلايا دون تحريض مسبق على تمايزها في الوسط الصنعي؟ وقد أشارت دراسات عدّة إلى أن الخلايا الجذعية المتوسطة غير المتميزة قد تنتقل ضمن العضوية الحية إلى مكان الأذية النسيجية لتقوم بتعويض النالف من الخلايا⁽²⁸⁾. تدعم هذه الفرضية تقارير حديثة بيّنت أن تحسّن الوظيفة الانقباضية لعضلة القلب لدى الجرذان بعد زرع خلايا جذعية متوسطة جردية قد نتج عن الوظيفة الإفرازية للخلايا الجذعية المغترسة وليس بالضرورة عن تمايز الخلايا المزروعة إلى خلايا العضلة القلبية⁽⁹⁾.

الاستنتاجات

نعتقد -وبحسب معلوماتنا- أنّ بحثنا هذا هو الأول على المستوى الوطني لعزل الخلايا الجذعية المتوسطة وتمييزها وتمايزها، ونأمل أن نكون بهذا قد أسهمنا في وضع حجر الأساس لعزل هذه الخلايا وتكثيرها، وحفظها بالتجميد، والإفادة منها لاحقاً في التطبيقات المختلفة السريرية والبحثية لإيجاد بدائل علاجية خلوية واعدة للعديد من الأمراض المستعصية.

Acknowledgements شكر

يتقدّم الباحثون بالشكر العميق للهيئة العامة للتقانة الحيوية التي مولت البحث، فضلاً عن توفيرها جميع التجهيزات اللازمة للقيام بالتجارب في مخبر التقانات الحيوية الصيدلانية والمناعية التابع لها. يشكر الباحثون الإدارة والطاقمين الطبيّين والتمريض في مستشفى التوليد الجامعي بجامعة دمشق، وذلك للتعاون والتسهيلات التي قدّموها للحصول على عينات الحبل السري. حصل البحث على منحة داعمة من الهيئة العليا للبحث العلمي.

REFERENCES المراجع

1. Cognet, P.A., and Minguell J. J., 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol*; V.181, pp. 67-73.
2. Meirelles, L.D.S., Caplan, A.I., and Nardi, N., 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*; V.26, pp. 2287-2299.
3. Haniffa, M.A., Collin, M.P., Buckley, C.D., and Dazzi, F., 2009. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*; V.94, pp. 258-263.
4. Keating, A., 2012. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, V.10, pp. 709-716.
5. Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S., 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*; V.25, pp. 1384-1392.
6. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*; V.24, pp. 1294-1301.
7. Bobis, S., Jarocha, D., and Majka, M., 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histological Et Cytobiological*; V.44, pp. 215-230.
8. Martins, A.A., Paiva, A., et al., 2009. Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplantation Proceedings*; V.41, pp. 943-946.
9. Li, Z., Guo, J., Chang, Q., and Zhang, A., 2009. Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Biol. Pharm. Bull.*; V.32, pp. 1343-1346.
10. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., et al., 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*; V.25, pp. 319-331.
11. Sakamoto, T., Ono, H., et al., 1996. Electron microscopic histochemical studies on the localization of hyaluronic acid in Wharton's Jelly of human umbilical cord. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*; V.48, pp. 501-507.
12. Klimanskaya, I., Rosenthal, N., and Lanza, R., 2008. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*; V.7, pp. 131-142.
13. Le Blanc, K., and Ringde, N., 2007. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Internal Medicine*, V.262, pp. 509-525.
14. Le Blanc, K., Frassoni, F., et al., 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, V.371, pp. 1579-1586.
15. McNeish, J., 2004. Embryonic stem cells in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*; V.3, pp. 70-80.
16. Pouton, C.W., and Haynes, J.M., 2007. Embryonic stem cells as a source of models for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 605-616.

17. Baertschiger, R.M., Serre-Beinier, V., et al., 2009. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One*; V.4., e6657.
18. Malgieri, A., Kantzari, E., et al., 2010. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, V.3, pp. 248-269.
19. Sensebe, L., Krampera, M., et al., 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*; V.98, pp. 93-107.
20. Majore, I., Moretti, P., et al., 2009. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Communication and Signaling*; V.7, p. 6.
21. Zhu, H., Mitsuhashi, N., et al., 2006. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*; V.24, pp. 928-935.
22. Drexler, H., and Wollert, K.C., 2009. Bone marrow cell therapy for MI; goal achieved? *Nature Reviews Cardiology*; V. 6, pp. 615-616.
23. Schlechta, B., Wiedemann, D., and Kittinger, C., 2010. Ex-vivo expanded umbilical cord blood stem cells retain capacity for myocardial regeneration. *Circulation Journal*, V.74, pp. 188-194.
24. Psaltis, P.J., Zannettino, A.C.W., Worthley, S.G., and Gronthos, S., 2008. Mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells*; V.26, pp. 2201-2210.
25. Fu-jiang, C., and Shi-qing, F., 2009. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chinese Medical Journal*; V.122, pp. 225-231.
26. Wagner, W., Wein, F., et al., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*; V.33, pp. 1402-1416.
27. Bianco, P., 2011. Back to the future: moving beyond mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*; V.112, pp. 1713-1721.
28. Trounson, A., 2009. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Medicine*; V.7, p. 29.