عزل وتكثير الخلايا الجذعية الميزنشيمية من نسيج الحبل السُرّي باستعمال مصل دم الحبل السُرّي كبديل للمصل الجنيني البقري

غمكين حسن* عصام قاسم**

مجد الجمالي***

الملخص

يعدّ نسيج الحبل السُرّي مصدرا للخلايا الجذعية التي يمكن استعمالها علاجياً وبحثيا نظراً لقدرتها على التمايز لأنواع خلوية مختلفة إضافة لخصائصها المثبطة للمناعة والمضادة للالتهاب. قمنا في هذا البحث بتطبيق طريقة بسيطة وكفؤة اقتصادياً لعزل هذه الخلايا دون استعمال إنزيمات هاضمة لنسيج الحبل السُرّي مع استبدال المصل الجنيني البقري التجاري الضروري لإكثار الخلايا بمصل دم الحبل السُرّي بتركيز 10% المحضرّ يدوياً، ودراسة تأثير هذا الاستبدال على مورفولوجية الخلايا الجذعية وخصائصها الجذعية بالمقارنة مع المصل الجنيني البقري 20%. وقد وجدنا انه يمكن عزل الخلايا الجذعية من الحبل السُرّي بطريقة بسيطة من خلال تقطيعه وزرع القطع مباشرة، وأن مصل دم الحبل السُرّي 10% يمكن أن يستخدم في العزل والتكثير بديلاً عن مصل الجنين البقري 20%، حيث حافظت الخلايا الجذعية على قدرتها على الانقسام والتجدد الذاتي وعلى خصائصها الجذعية متمثلةً في قدرتها على التّمايز الشحمي والعظمي والتعبير عن عناقيد التمايز (CD44, CD90,CD105).

الكلمات المفتاحية: الخلايا الجذعية الميزنشيمية، المصل الجنيني البقري، مصل دم الحبل السري.

* كلية الصيدلة– جامعة دمشق.

** الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

*** كلية الصيدلة– جامعة دمشق– الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem Cells: Umbilical Cord Blood Serum as Replacement of Fetal Bovine Serum

Ghmkin Hassan[*] **Issam Kasem**[**]

Majd Aljamali[***]

Abstract

Mesenchymal stem cells are multipotent stem cells that can be isolated from umbilical cord and can be used therapeutically because of their ability to differentiate to various types of cells, in addition to their immunosuppressive and anti-inflammatory characteristics. We here employed simple and economically efficient protocol to isolate these cells without using enzymes to digest umbilical cord tissues and replaced fetal bovine serum with umbilical cord blood serum 10% and studed the effect of this replacement on morphology and cell stemness characteristicsin comparion with fetal bovine serum 20%. We found that umbilical cord blood serum could be used to isolate stem cells from the umbilical cord in a simple manner by cutting umbilical cord and transplant the pieces immediately. In addition, umbilical cord blood serum 10% could be used instead of fetal bovine serum 20% for cell isolation and expansion, in which the stem cells maintained their stemness characters (ability to differentiate to adipocytes and osteocytes and express mesenchymal stem cell specific clusters of differentiation (CD44, CD90, CD105).

Keyword: Mesenchymal stem cells, fetal bovine serum, umbilical cord blood serum.

[*] Faculty of pharmacy, Damascus University.
[**] National commission for biotechnology.
[***] Faculty of pharmacy, Damascus University. National commission for biotechnology.

المقدمة:

تمتلك الخلايا الجذعية قدرة كبيرة على تجديد الأنسجة المصابة وتعويض فقدان الخلايا، حيث تعرف هذه الخلايا بامتلاكها ثلاثة خصائص رئيسية، فهي تستطيع تجديد نفسها طوال الحياة إضافة إلى قدرتها على التمايز إلى عدد من الأنماط الخلوية المختلفة وترميم الأنسجة التي تقطن فيها[1].

الخلايا الجذعية الميزنشيمية Mesenchymal stem cells (MSCs)، من أهم أنواع الخلايا الجذعية وتتواجد بعدة أنسجة منها نقي العظم Bone marrow والنسيج الشحمي adipo tissue، بالإضافة إلى الحَبْلِ السُرّي Umbilical cord. تمتلك هذه الخلايا القدرة على التمايز لعدة أنواع خلوية، فقد تم تحويلها لخلايا شحمية Adipocytes وخلايا عظمية Osteoblasts وخلايا غضروفية Chondrocytes[2] وخلايا عضلية Myoblasts [3].

يعدّ الحبل السُرّي من أهم مصادر الخلايا الجذعية الميزنشيمية MSCs، يتميز عن المصادر الأخرى بأنه مصدر غير باضع لجمع الخلايا الجذعية يتم التخلص منه بعد الولادة عادةً، كما أنّ الخلايا المشتقّة منه لا تثير أية مشاكل أخلاقية بخلاف الخلايا الجذعية الجنينية المشتقّة من مرحلة الكيسة الأرومية للأجنّة البشرية[1، 4].

نظراً لخصائصها المعدّلة للمناعة والمضادة للالتهاب تمتلك الخلايا الجذعية الميزنشيمية فوائد علاجية جّمة، كما زادت سهولة الحصول عليها من الدراسات السُرّيرية المجراة على هذا النوع من الخلايا. تشكل الطرق البسيطة والقليلة التكلفة نسبياً للحصول على هذه الخلايا من أكثر دوافع توسع هذه الدراسات[5]، والتي أسست لبروتوكولات ذات جدوى اقتصادية لعزل وتكثير الخلايا الجذعية عملت على توفير خطوط خلوية للخلايا الجذعية التي تعد ركيزة للأبحاث اللاحقة، بحيث تميزت المخابر العلمية العالمية ببروتوكولاتها الخاصة المبنية على خصوصية هذه المخابر وخبراتها، مع تباين هذه البروتوكولات بين هذه المخابر بشكل كبير [6، 7].

توجد طريقتان أساسيتان لعزل الخلايا الجذعية من نسيج الحبل السُرّي البشري: تعتمد الأولى على استعمال أنزيمات هضم، ومن هذه الإنزيمات الكولاجيناز والهيالورينداز لهضم نسيج الحبل وتحرير الخلايا من النسيج ثم زرعها على أطباق بلاستكية تسمح لها بالالتصاق، تعتمد الطريقة الأخرى بشكل أساسي على قدرة الخلايا الجذعية الميزنشيمية على الهجرة من النسيج والتصاقها على السطوح البلاستيكية لأوعية الزرع[5]. من جهة أخرى تستخدم أغلبية بروتوكولات عزل وزرع الخلايا الجذعية الميزنشيمية MSCs المصل الجنيني البقري Fetal bovine serum (FBS) كمضاف رئيسي لتحفيز نمو الخلايا في أوساط الزرع Culture media، حيث يدعم هذا المصل نمو وتكاثر الخلايا نظراً لاحتوائه على عوامل النمو والهرمونات والعوامل التي تساعد على الالتصاق، بالإضافة إلى الفيتامينات والحموض الامينية والشحوم. وقُدّر أن المصل الجنيني البقري يحتوي على ما يقارب من ألف عنصر بيولوجي[8]، وفي الواقع، يتم التحكّم بتكاثر الخلايا الجذعية وقدرتها التجديدية بواسطة مجموعة معقدة من الإشارات الخلوية، والتي تكتنف الارتباط الخلوي– الخلوي بالإضافة للعوامل والبروتينات المنحلة، والتي تتواجد أيضاً في المصل الجنيني البقري[6]. من جهةٍ أخرى، يمتلك هذا المصل العديد من المساوئ نظراً لمصدره الحيواني، حيث يمكن أن يسبب ردود فعل مناعية عند استعماله في العلاجات السريرية المعتمدة على الخلايا الجذعية، والتي يجب أن تكون خالية أيضاً من جميع المواد ذات المصدر الحيواني. لذلك دُرِس تأثير المواد ذات الأصل البشري، كمصل الدم المحيطي ومصل دم الحبل السُرّي بالإضافة لمشتقات الدم الأخرى، على نمو وتكاثر عدة أنواع خلوية. ويعدّ مصل دم الحبل السُرّي أحد بدائل المصل الجنيني البقري الواعدة، حيث

تبيّن أنه يدعم نمو وتكاثر الخلايا الجذعية الميزنشيمية نظراً لغناه بالعديد من عوامل النمو والعوامل المحفزة للاستقلاب، إضافة لكونه لا يحتوي على عوامل غريبة ويتم التخلص منه بعد الولادة [9، 10]. من جهةً أخرى يُعدّ الحصول على عدد كبير من الخلايا الجذعية من أهم متطلبات العلاجات السُرّيرية والدراسات البحثية، ولذلك أصبح البحث عن طرق فعالة تستعمل مواداً تحقق جميع هذه المتطلبات، إضافةً إلى متطلبات الأمان والكلفة المنخفضة، الهدف الأساسي لضمان الأمان والفعالية. وهكذا فإن التوصل إلى طريقة كفوءة واقتصادية لعزل وتكثير الخلايا الجذعية الميزنشيمية، تستبدل بعض الكواشف ذات المصدر الحيواني بمشتقات الدم البشري وتستغني عن إضافة عوامل النمو باهظة الثمن، سيؤسس للانطلاق بالبحوث الخاصة بهذه الخلايا محلياً وعربياً [11,6]. قد هدف بحثنا إلى اختبار وتوطين بروتوكول بسيط لعزل الخلايا وتكثيرها باستعمال أحد بدائل المصل الجنيني البقري رخيصة الثمن وسهلة التحضير محلياً، يمكن تحضيرها في أبسط المخابر العلمية وهو مصل دم الحبل السُرّي، ومقارنة تأثيره على نمو وتكاثر وتمايز الخلايا الجذعية مع المصل الجنيني البقري.

المواد والطرائق:

تحضير مصل دم الحبل السُرّي

جُمعَ دم الحبل السُرّي مباشرة بعد الولادة ضمن أنابيب 50 مل (primo EZ Tube, Euroclone, Italy) دون مضاد تخثر من ولادات نساء صحيحات ظاهرياً من مستشفى التوليد الجامعي في دمشق بعد أخذ الموافقة المستنيرة، وتُركت الأنابيب مدة 12- 16 ساعة للسماح للدم بالتخثر بدرجة حرارة الغرفة. ثُفل الدم المتخثر بعد ذلك بسرعة 1000g مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 20م ثم جمع المصل وفُلتر باستعمال فلاتر 0.22 ميكرون (Ministart,sartourius Stediumbiotech,Germany) وتم تعطيل المتممة من خلال التسخين لدرجة 56 م لمدة 30 دقيقة، ثم حفظت جُميعات pools المصل بدرجة -20 م لحين الاستعمال.

جمع العينات وعزل الخلايا الجذعية

اشتريت أوساط الزرع جميعها والمضافات المستعملة في العزل والزرع (DMEM وFBS وبنسلين- ستربتومايسين وأمفوتريسين وPBS وTrypsin 0.05%, EDTA) من شركة (Euroclon, italy). جُمعت عينات من الحبل السُرّي من ولادات قيصرية إذْ جُمعت 3 عينات من ولادات لأمهات صحيحات ظاهرياً ضمن وقاء PBS المُدعّم بمضاد جرثومي1% (بنسلين-ستربتومايسين) و 1ميكرون/مل مضاد فطري (أمفوتريسين)، ونقلت العينات إلى المخبر حيث غسلت بوقاء PBS المُدعّم بمضادات الجرثومية والفطرية. قُطّع الحبل إلى قطع بطول 5 ملم تقريباً، وشُقّت عرضياً، ونزعت منها الأوردة والشرايين، وزرعت قطع الحبل السُرّي (5 ملم) بعد إجراء شقوق باستعمال المشرط لتسهيل هجرة الخلايا ضمن فلاسكات 25 سم^2 ضمن وسطين مختلفين(DMEM , 20% FBS) أو (DMEM, 10% CBS) (شكل 1).

استُبدلت الأوساط بعد 7 أيام من الحضن، ثم استُبدلت مرتين في الأسبوع حتى الوصول إلى احتشاد confluency80-90%. مُررت passaged الخلايا بمعاملتها بTrypsin 0.05%, EDTA وثُفلت بعد ذلك بقوة 300g مدة 5 دقائق وعدَّت الخلايا باستعمال أزرق التريبان 0.4% (Euroclone, Italy) لتحديد حيوية الخلايا وعددها.

السعة التكاثُرية:

لتحديد تأثير استبدال مصل الجنيني البقري بمصل دم الحبل السُرّي في تكثير الخلايا الجذعية. أُعيد زرع الخلايا بكثافة 2000 خليةاسم2 بعد كل إمرارpassage حتى الوصول إلى الإمرار passage الثالث P3 ضمن أطباق ذات 12 بئراً، وضمن وسط الزرع (DMEM , 20% FBS)، أو(DMEM, 10% CBS). وعند الوصول إلى احتشاد 80-

90%، مُررت الخلايا، كما وصف سابقاً، وعُدت الخلايا بعد كل إمرار، وحُسب زمن تضاعف الجمهرة الخلوية Population doubling time (PDT) من خلال المعادلة:

$$PDT = \frac{T \times (Log10(N1)-Log10(N0))}{Log10(2)}$$

إذْ N0: عدد الخلايا البدئية، N1 : عدد الخلايا بعد إمرارها، T: مدة الزرع

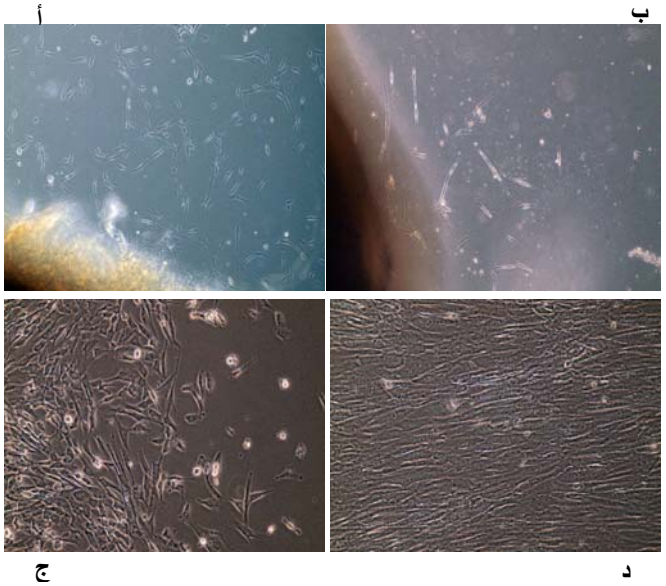
كما حسب عدد تضاعفات الجمهرة population doublings من خلال المعادلة: PD= N1\N0، وعُبر ذلك على شكل عدد مرات تضاعف الجمهرة التراكمي Cumulative population doublings. وحُسبت المتوسطات باستعمال برنامج SPSS الإحصائي مع اعتماد P<0.05 لتقييم الأهمية الإحصائية.

التنميط الجزيئي للخلايا

عُزل RNA من الخلايا في نهاية الإمرار الثالث باستعمال عتيدة (RNeasy Mini Kit – QIAGEN,Germany)، ثم حُوّل إلى دنا متمم c.DNA باستعمال عتيدة (RevertAid First Strand Synthesis Kit- Thermofischer,USA) وأجري تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR لعناقيد التمايز المميزة للخلايا الجذعية الميزنشيمية (CD44, CD90,CD105) باستعمال المرئسات الآتية:

التسلسل	CD
5-AAGGTGGAGCAAACACAACC-3 5- ACTGCAATGCAAACTGCAAG -3	**CD44**
5- GGACTGAGATCCCAGAACCA -3 5- ACGAAGGCTCTGGTCCACTA -3	**CD90**
5- CACTAGCCAGGTCTCGAAGG -3 5- CTGAGGACCAGAAGCACCTC -3	**CD105**

وأُستعمل البرنامج الحراري التالي في التضخيم: التمسيخ البدئي initial denaturation: بدرجة حرارة 95^{0}س مدة 5 دقائق مرة واحدة، 35 دورة تضمنت المراحل الآتية:



(الشكل 1) هجرة الخلايا من قطع الحبل السُرّي ضمن وسط زرع مُدعّم بـ أ) FBS 20% تكبير (150مرة) أو بـ ب) CBS 10%تكبير (150مرة) ج+د) مورفولوجية الخلايا المعزولة قبل إمرارها والمعزول ضمن وسط مُدعّم بـ ج) CBS 10% تكبير (300مرة) أو بـ د) FBS 20% تكبير (300 مرة)

- التمسيخ denaturation: درجة حرارة 95^{0}س مدة 30 ثانية،
- الالتحام Annealing: اختلفت درجة حرارة الالتحام حسب القطعة المضخمة كالآتي:

CD44: درجة الحرارة 53^{0}س،**CD90:** درجة الحرارة 54^{0}س،**CD105:** درجة الحرارة 55^0 س.

- الإطالة Extension: بدرجة حرارة 72^{0}س مدة 30 ثانية،
- الإطالة النهائية Final Extension: بدرجة حرارة 72^{0}س مدة 10 دقائق.

تمايز الخلايا

التمايز الشحمي

زُرعت الخلايا في نهاية الإمرار الثالث المزروعة ضمن وسط مُدعّم بأحد المضافين (FBS أو CBS) بتركيز 10 آلاف خلية /بئر ضمن أطباق تحوي 96 بئراً. وبعد 24 ساعة، أُضيف الوسط الشاهد (DMEM , 20% FBS) أو (DMEM, 10% CBS) إلى عدة آبار في حين أضيف الوسط المحرض على التمايز من شركة (hMSC adipogenic differentiation kit,Euroclone,Italy) إلى آبار أخرى، ولونت الخلايا بعد 3 أسابيع باستعمال ملون أحمر السودان لفحص وجود القطيرات الشحمية، حيث ثبتت الخلايا بواسطة الفورمالين مدة 20 دقيقة، ثم أضيف ملون أحمر السودان Sudan Red في مزيج الإيزوبروبانول والماء بنسبة (2:3)، وحضنت مدة 5 دقائق، ثم غُسلت بالماء المقطر، وأخذت الصور بكاميرا المجهر المقلوب من شركة (Olympus,Japan).

التمايز العظمي

زُرعت الخلايا في نهاية الإمرار الثالث المزروعة ضمن وسط مُدعّم بأحد المضافين (FBS أو CBS) بتركيز 10 آلاف خلية /بئر ضمن أطباق تحوي 96 بئراً وبعد 24 ساعة أضيف الوسط الشاهد (DMEM , 20% FBS) أو (DMEM, 10% CBS). أو الوسط المحرض على التمايز الحاوي على 10% FBS و 0.1 mM ديكساميتازون و50mM حمض الاسكوربيك و10 mM بيتاغليسروفوسفات، ولُونت الخلايا باستعمال ملون أحمر الألزرين 2% Alizarine Redبعد 3 أسابيع من الزرع بعد تثبيت الخلايا بواسطة الفورمالين مدة 20 دقيقة وأخذت الصور بكاميرا المجهر المقلوب (Olympus,Japan).

النتائج:

استعملت في الدراسة طريقة عزل تعتمد على قدرة الخلايا الجذعية الميزنشيمية على الهجرة والالتصاق دون استعمال أنزيمات لهضم نسيج الحبل السُرّي، وقد بدت خلايا مغزلية الشكل ملتصقة بسطح الفلاسك وقد هاجرت من القطع بعد 7– 10 أيام من زرع القطع (الشكل 1) حيث أزيلت القطع بعد 12– 15 يوماً عند خروج عدد مناسب من الخلايا.

وتُركت الخلايا ليزداد عددها، وبعد نحو20–25 يوماً، كانت الخلايا تغطي مساحة واسعة من الفلاسك. وقد أبدت الخلايا قدرة على الهجرة والتكاثر ضمن وسط الزرع المُدعّم بكلا المصلين FBS أو CBS.

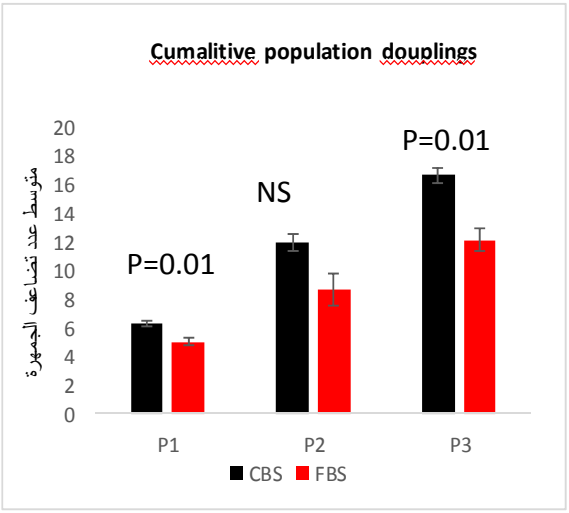
نُقلت الخلايا ومرّرت وصولاً إلى الإمرار الثالث، وقد بدت الخلايا المزروعة ضمن FBS وCBS ذات شكل مغزلي أرومي ليفي Fibroblast ذي نواة عديدة النويّات. وكُثّرت الخلايا حتى الإمرار الثالث إذْ حافظت هذه الخلايا على مورفولوجيتها طول مدة الزرع، ولم تظهر أية اختلافات بين الخلايا المزروعة ضمن وسط المُدعّم بالمصل الجنيني البقري أو المُدعّم بمصل دم الحبل السُرّي، (الشكل1).

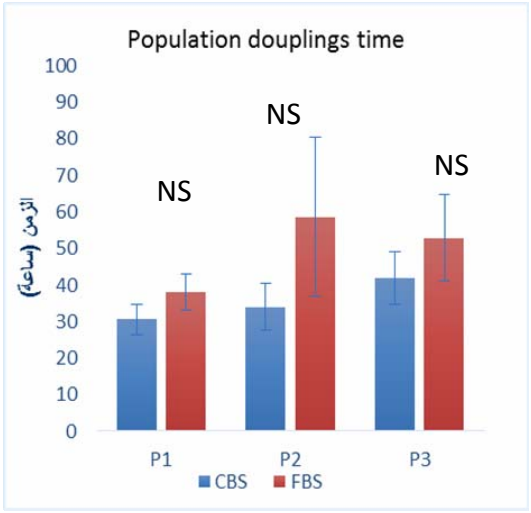
السعة التكاثُرية

زُرعت الخلايا ضمن كل إمرار من الإمرارات الثلاثة (p1-p2-p3) ضمن وسطين مختلفين، أحدهما مُدعّم ب FBS 20% والآخر ب CBS 10% وبالكثافة نفسها 2000 خلية/سم2 ضمن ثلاث حجرات في أطباق ذات 12بئراً. وعند الوصول إلى درجة احتشاد 80–95% أُجري الإمرار

وحسب متوسط زمن تضاعف الجمهرة (PDT) ومتوسط عدد تضاعف الجمهرة (PD). وقد أدى استبدال المصل إلى زيادة عدد تضاعف الجمهرة الخلوية التراكمي cumulative population doublings وبفارق ذي دلالة إحصائية في نهاية الإمرار الثالث (إذْ وصل إلى 17 تضاعفاً بنهاية الإمرار الثالث بوجود مصل دم الحبل السُرّي CBS في مقابل 12 تضاعفاً فقط بوجود FBS، وقد كانت قيمة p-value، p= 0.01). أمَّا زمن تضاعف الجمهرة فقد انخفض خلال الإمرارات الثلاثة عند استعمال CBS بالمقارنة مع FBS، ولكن دون وجود دلالة إحصائية (شكل2).

ب أ





(الشكل2) : أ) متوسط عدد تضاعف الجمهرة الخلوية التراكمي للخلايا الجذعية الميزنشيمية المنماة في وسط مُدعّم إمّا بـ (CBS) أو(FBS) فضلاً عن الخطأ المعياري، ب) متوسط زمن تضاعف الجمهرة التراكمي للخلايا الجذعية الميزنشيمية المنماة في وسط مُدعّم إمّا بـ (CBS) او (FBS) فضلاً عن الخطأ المعياري.

NS* : not significantغياب الأهمية الإحصائية

التنميط الجزيئي للخلايا

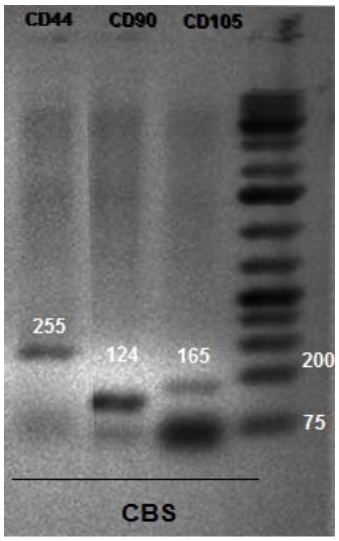
للتأكد من محافظة الخلايا المعزولة والمنماة حتى الإمرار الثالث على خصائصها الجذعية عزل RNA من الخلايا المزروعة ضمن كل من الوسطين على حدة (FBS أوCBS)، وحُول إلى الدنا المتمم c.DNA وأجرينا تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR للتأكد من تعبير هذه الخلايا عن عناقيد التمايز الخاصة بالخلايا الجذعية الميزنشيمية (CD44, CD90,CD105)، ورُحلّت نتائج تفاعل PCR على هلامة أغاروز 1% وقد عبّرت الخلايا المزروعة ضمن الوسطين عن مورثات هذه العناقيد الثلاثة، (الشكل 3).

التمايز

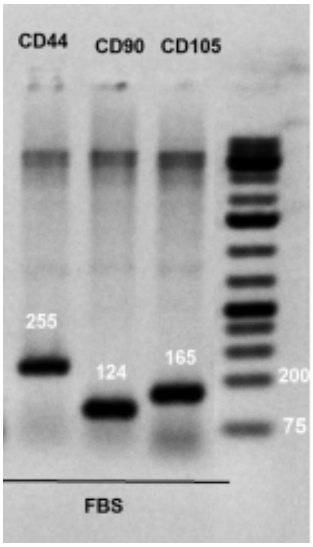
التمايز الشحمي

تغيرت مورفولوجية الخلايا المعزولة والمنماة بوسط مُدعّم بإحدى المضافات (FBS أو CBS) بعد 3 أسابيع من إضافة وسط التمايز، إذْ لُحظ تسطح الخلايا وتكون حويصلات ضمنها. ولكشف المحتوى الشحمي لهذه الحويصلات، لُوّنت الخلايا بملون أحمر السودان الذي يلون القطيرات الشحمية، وقُورن تلون الخلايا بالشاهد المزروع بالوسط المُدعّم بـ (FBS أو CBS) دون إضافة وسط التمايز. وقد تلونت الخلايا المزروعة ضمن كلا الوسطين المضاف إليهما وسط التمايز باللون الأحمر، ممَّا يدلُّ على تشكل القطيرات الشحمية بالمقارنة بالشاهد المضاف إليها وسط زرع مدّعم بـ FBS أو CBS، (الشكل 4).

أ

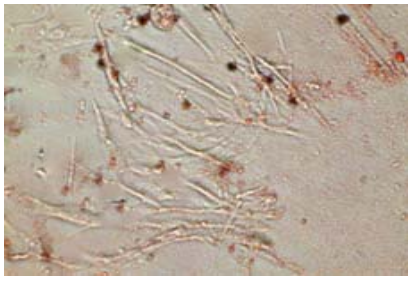


ب

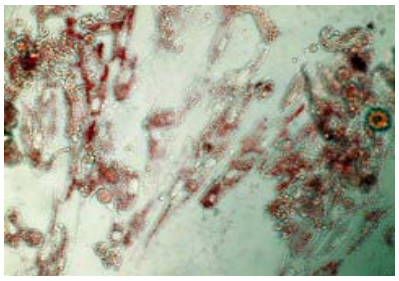


الشكل(3) نتائج رحلان تفاعل PCR، وتظهر في الشكل الأوزان الجزيئية لنواتج التضخيم أ) تعبير الخلايا المزروعة ضمن وسط مُدعّم بـ CBS عن عناقيد التمايز (CD44, CD90,CD105) المميزة للخلايا الجذعية الميزنشيمية ب) تعبير الخلايا المزروعة ضمن وسط مُدعّم بـ FBS عن عناقيد التمايز (CD44, CD90,CD105)

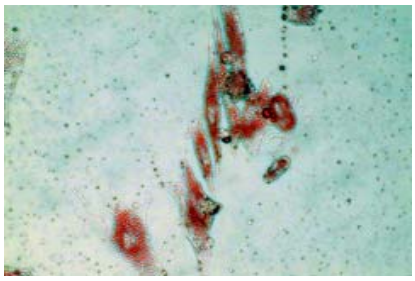
أ



ب



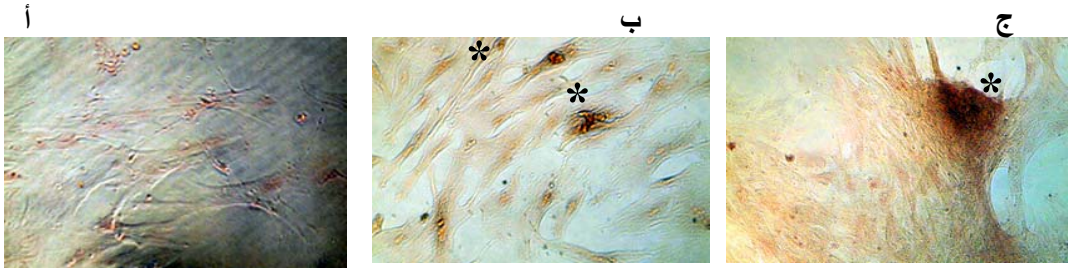
ج



الشكل (4) التمايز الشحمي للخلايا الجذعية المزروعة ضمن الوسط المُدعّم بـ (FBSأو CBS) والملونة بواسطة ملون أحمر السودان أ) الشاهد المزروع دون إضافة وسط التمايز، ب) الخلايا المزروعة ضمن وسط مُدعّم بـ FBS بعد 3 أسابيع من إضافة الوسط المحرض على التمايز الشحمي، ويلْحظ تلون القطيرات الشحمية باللون الأحمر. ج) الخلايا المزروعة ضمن وسط مُدعّم بـ CBS بعد 3 أسابيع من إضافة الوسط المحرض على التمايز الشحمي ويلْحظ تلون القطيرات الشحمية باللون الأحمر.

التمايز العظمي

تغيرت مورفولوجية الخلايا المعزولة والمنماة بالوسط المُدعّم بإحدى المضافات (FBS أو CBS) والمضاف إليها وسط التمايز، إذ لُحِظَ تحول الخلايا إلى الشكل المستطيل المتراص بجانب بعضها وتشكيلها طبقات، وهو شكل مميز للخلايا العظمية. ولونت الخلايا بملون أحمر الألزرين الذي يكشف توضع الكالسيوم ضمن الخلايا وقورن تلون الخلايا بالشاهد المزروع بالوسط المُدعّم ب (FBS أو CBS) دون إضافة وسط التمايز. وقد تلونت الخلايا المزروعة ضمن كلا الوسطين باللون الأحمر أو البرتقالي؛ ممَّا يدلُّ على تموضع حبيبات الكالسيوم ضمن الخلايا المتمايزة بالمقارنة بالشاهد، (الشكل5).



الشكل (5) التمايز العظمي للخلايا الجذعية المزروعة ضمن الوسط المُدعّم بـ (FBSأو CBS) والملونة بملون أحمر الألزرين. أ) الشاهد المزروع دون إضافة وسط التمايز. ب) الخلايا المزروعة ضمن وسط مُدعّم بـ FBS بعد 3 أسابيع من إضافة الوسط المحرض على التمايز. ج) الخلايا المزروعة ضمن وسط مُدعّم بـ CBS بعد 3 أسابيع من إضافة الوسط المحرض على التمايز العظمي. وتدلُّ النجمات على تلون تكدسات الخلايا باللون البرتقالي المائل للأحمر.

المناقشة:

تشكل الخلايا الجذعية الأساس في الطب التجديدي والترميمي نظراً إلى قدرتها على التمايز لأنواع خلوية أخرى، وتعدُّ الخلايا الجذعية الميزنشيمية التي تعرّف بأنها خلايا قادرة على التضاعف وملتصقة على السطوح البلاستيكية وتُعبّر عن عناقيد التمايز (CD73,CD44, CD90,CD105) من الأنواع المستعملة بصورة متزايدة في التجارب[1].

قمنا في هذا البحث بدراسة تأثير استبدال مصل دم الحبل السُرّي البشري كبديل للمصل الجنيني البقري في عملية عزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية وتكثيرها من نسيج الحبل السُرّي بطريقة الزروعات Explant، إن تطبيق بروتوكول بسيط للعزل يتم فيه الاستغناء عن استعمال الأنزيمات والمصل الجنيني البقري يحقق كفاءة اقتصادية، ويؤمن خلايا جذعية دون الحاجة لاستعمال مصل من أصل حيواني بحيث يمكن استعمالها بشكل مباشر في البحوث السريرية[12]. وتشير نتائجنا إلى أن زرع قطع من الحبل السُرّي بعد عملية تقطيع الحبل السُرّي وإزالة الأوعية الدموية ضمن وسط مُدعّم بالمصل المحضر من دم الحبل السُرّي قد سمح للخلايا الجذعية الميزنشيمة بالخروج من القطع والتكاثر، ومكننا من الحفاظ على هذه الخلايا حتى الإمرار الثالث دون تبدل في مورفولوجيتها بالمقارنة بالخلايا التي عزلت وزرعت ضمن وسط مُدعّم بالمصل الجنيني البقري. وبيَّنت نتائجنا أن الوسط المُدعّم بمصل دم الحبل السُرّي (10%) قد سمح للخلايا الجذعية بالتكاثر بشكل أفضل من المصل الجنيني البقري (20%)، إذْ استعملنا المصل الجنيني البقري بأكبر تركيز مستخدم عادة في الزرع الخلوي(20%)، وقد أدى استبدال بالمصل الجنيني البقري مصل دم الحبل السري البشري إلى زيادة عدد تضاعف الجمهرة الخلوية التراكمي الذي وصل إلى 17 تضاعفاً بنهاية الإمرار الثالث بوجود مصل دم الحبل السُرّي CBS، في مقابل 12 تضاعفاً بوجود التركيز الأعظمي، إذْ يدلَّ عدد تضاعف الجمهرة التراكمي على إمكانية الخلايا على الانقسام بعد عدد محدد من الإمرارت، وزيادته تسمح بالحصول على عدد أكبر من الخلايا، زيادة على ذلك فقد انخفض زمن تضاعف الجمهرة خلال الإمرارات الثلاثة في الوسط المدعّم ب CBS بالمقارنة مع FBS، ولكن دون وجود دلالة إحصائية، ويعُبّر زمن تضاعف الجمهرة عن سرعة الانقسام. وقد وجدنا أنَّ استعمال CBS يزيد سرعة الانقسام قليلاً، ودون وجود دلالة إحصائية بالمقارنة بتأثير 20% من FBS .

كما بيَّنت نتائجنا محافظة هذه الخلايا على التعبير عن جينات عناقيد التمايز المميزة للخلايا الجذعية الميزنشيمية (CD44, CD90,CD105) في نهاية الإمرار الثالث فضلاً عن احتفاظها بقدرتها على التمايز للخلايا العظمية والشحمية، وذلك كلّه يؤكد محافظة الخلايا المزروعة بوسط مُدعّم ب CBS على خواصها الجذعية.

وهكذا، فإن استعمال مصل دم الحبل السُرّي في زرع الخلايا الجذعية الميزنشيمية المشتقة من نسيج الحبل السُرّي قد حافظ على خصائص الخلايا الجذعية عند العزل والتكثير. كما أنه سرّع نسبياً انقسام الخلايا وخفّض الزمن اللازم للحصول على العدد المطلوب من الخلايا اللازمة للتطبيقات العلاجية؛ ممَّا قد يسهم أيضاً في التقليل من إمكانية تبدّل الخلايا الناتج عن الزرع طويل الأمد. ويمكن تفسير نتائجنا بأن مصل دم الحبل السُرّي البشري هو غني بعوامل النمو والعوامل المحفزة للاستقلاب من أصل بشري،[10] إذْ ترتبط بشكل أفضل مع المستقبلات الخلوية للخلايا الجذعية المشتقة من الحبل السُرّي البشري، في حين تكون العوامل الموجودة ضمن FBS حيوانية المنشأ.

الاستنتاج:

أثبتنا أنَّ عزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية المشتقة من نسيج الحبل السرَي وتكثيرها باستعمال مصل دم الحبل السرَي يحافظ على الخصائص الجذعية للخلايا من خلال التعبير عن عناقيد التمايز الخاصة بالخلايا الجذعية الميزنشيمية، والقدرة على التمايز لخلايا عظمية وشحمية، وهكذا قمنا في هذه الدراسة بتوطين بروتوكول بسيط وسهل التطبيق نسبياً لعزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية بكلفة منخفضة دون استعمال أنزيمات هاضمة للنسيج، أو المصل الجنيني البقري الغالي الثمن.

Referance

1. Weiss, M.L. and D.L. Troyer, Stem cells in the umbilical cord. Stem Cell Reviews, 2006. 2(2): p. 155-162
2. Lee, O.K., et al., Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood, 2004. 103(5): p. 1669-1675.
3. Nartprayut, K., et al., Cardiomyocyte differentiation of perinatallyderived mesenchymal stem cells. Mol Med Rep, 2013. 7(5): p. 1465-9.
4.Kim, D.-W., et al., Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Charcterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. International Journal of Molecular Sciences, 2013. 14(6): p. 11692.
5. Can, A. and S. Karahuseyinoglu, Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells, 2007. 25(11): p. 2886-95.
6. Kinzebach, S. and K. Bieback, Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal cells under xenogenic-free culture conditions. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013. 129: p. 33-57.
7. Wolfe, M., et al., Isolation and culture of bone marrow-derived human multipotent stromal cells (hMSCs). Methods Mol Biol, 2008. 449: p. 3-25.
8. Hemeda, H., B. Giebel, and W. Wagner, Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy, 2014. 16(2): p. 170-80.
9. Challa, S.S., et al., Enhanced neogenic potential of Panc-1 cells supplemented with human umbilical cord blood serum--An alternative to FCS. Tissue Cell, 2011. 43(4): p. 266-70.
10. Rungsiwiwut, R., et al., Human Umbilical Cord Blood-Derived Serum for Culturing the Supportive Feeder Cells of Human Pluripotent Stem Cell Lines. Stem Cells Int, 2016. 2016: p. 4626048.
11. Kinzebach, S. and K. Bieback, Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions, in Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application I, B. Weyand, et al., Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 33-57.
12. Bieback K, Schallmoser K, Klüter H, Strunk D. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2008;35(4):286-294.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2016/02/08.
تاريخ قبوله للنشر 2016/05/12.