

كمون التمايز المتعدد لخلايا جذعية ميزنشيمية معزولة من الحبل السري البشري

الدكتور مجد الجمالي*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: تتمتع الخلايا الجذعية بقدرة فريدة على التمايز إلى العديد من أنواع الخلايا التي تعوض بشكل طبيعي الفاقد من بعض خلايا الجسم واللاحق لإصابة نسيجية. وبعد دم الحبل السري ونسيجه المصدرين الأهم للحصول على الخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs والخلايا الجذعية الميزنشيمية MSCs، على الترتيب، ويشكلان المادة الرئيسية في بنوك الخلايا الجذعية التي أسست في معظم أرجاء العالم وحديثاً جداً في سورية. مع ذلك، فقد ركزت البحوث في منطقتنا بشكل رئيس على أساليب حفظ الخلايا وتجميدها مع القليل من الدراسات التي أُجريت لتحديد قدرة الخلايا المحفوظة على التمايز في الزجاج. هدَفَ هذا البحث إلى اختبار القدرة الكامنة لخلايا جذعية ميزنشيمية، معزولة من نسيج حبل سري بشري مأخوذ من ولادة قيصرية في مشفى التوليد الجامعي في دمشق ومحفوظة بالتجميد، على التمايز لأنواع مختلفة من الخلايا استجابةً لعوامل نمو وتحريض نوعية لبعض النسائل الخلوية.

مواد البحث وطرائقه: بعد عزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية وإكثارها في الزجاج حتى الإمرار الرابع، حُفظت الخلايا بالتجميد في الآزوت السائل. وبعد إعادة زرع الخلايا المجمدة مدة ستة أشهر على الأقل، دُرست عيوشية هذه الخلايا التي وصلت إلى 80-90%، كما أبدت الخلايا قدرة تكاثرية شبيهة بتكاثرها قبل عملية التجميد. طُبقت خمسة بروتوكولات لتحريض تمايز الخلايا إلى خلايا شحمية، وعظمية، وعضلية، وعصبية، وخلايا منتجة للأنسولين، ووُثِّق كمن الخلايا المتعدد للتمايز إلى تلك النسائل الخمس عبر دراسة شكلياء الخلايا وتطبيق بعض اختبارات التلوين والتعبير الجيني والممتمز المناعي المرتبط بالأنزيم.

النتائج: تشير نتائج هذه الدراسة إلى إمكانية حفظ الخلايا الجذعية الميزنشيمية المعزولة من الحبل السري البشري بالتجميد، مع احتفاظها بقدرتها على التكاثر وبكمون التمايز المتعدد إلى خمسة نسائل خلوية مختلفة.

الاستنتاج: تشير نتائج هذا البحث إلى الفائدة المرجوة من حفظ نسيج الحبل السري فضلاً عن دم الحبل السري في بنوك الخلايا الجذعية المؤسسة حديثاً في سورية لاستخدام الخلايا الميزنشيمية كوسائل ناجعة في الطب التجديدي، وكعلاج بديل يهدف إلى استعادة القدرة الوظيفية المعوزة لبعض خلايا الجسم وأنسجته.

كلمات مفتاحية: خلايا جذعية ميزنشيمية، حبل سري، تمايز.

* مدرس - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة، جامعة دمشق،

Multi-Differentiation Potential for Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord

Majd Aljamali*

Abstract

Background& Objective: Stem cells have unique capability to differentiate into many cell types that can normally replace the loss in some cells of the body due to tissue injury. Umbilical cord blood (UCB) and umbilical cord (UC) are the two main sources for hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs), respectively, which constitutes the basis for stem cell banks that have been established worldwide and very recently in Syria. Research in our region has mainly focused on cell storage and freezing protocols, and only few studies were conducted to prove the ability of the stored cells to differentiate into their destined lineages. This study aimed to test the potential of cryopreserved MSCs isolated from an umbilical cord taken from new delivery at Maternity University Hospital in Damascus, to differentiate into various types of cells in response to growth and induction factors specific to cell lineages.

Materials & Methods: after isolation, MSCs proliferated in vitro up to fourth passage and were stored by freezing in liquid N₂ for at least 6 months. After re-culturing the stored cells, the viabilities of these cells were between 80-90%, and these cells demonstrated similar proliferative characteristics in comparison to the cells prior to cryopreservation. Five protocols were applied on re-cultured cells to induce their differentiation into adipocytes, osteocytes, myocytes, neurocytes, and insulin producing cells (IPCs). MSC differentiation was confirmed by studying cell morphologies and applying cell staining protocols, gene expression testing, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: Results showed the multi-differentiation potential of MSCs isolated from umbilical cord after cryopreservation, thereby, confirming the negligible effect of cryopreservation on MSCs differentiation potential to five different cell lineages.

Conclusion: These results point to the possible benefits of storing umbilical cords as well as UCB in recently established stem cell banks in Syria to use cord-derived MSCs as successful tools in regenerative medicine, aiming ultimately to implant MSCs in vivo as an alternative therapy to regain the defective function of specific cell and tissue types.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs), umbilical cord, differentiation.

* Assistant Professor in Dept. of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Pharmacy, Damascus, University.

مقدمة:

للتطبيقات الداعمة لاغتراس الخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs transplantation، ويدخل ذلك كله ضمن سياق ما يدعى بالطب التجديدي regenerative medicine الهادف إلى تعويض الفاقد أو التالف من خلايا الجسم بخلايا فعالة وظيفياً⁵. وتجدر الإشارة إلى أن عملية الاستشفاء healing وترميم الأنسجة هي عملية معقدة وتتطلب اندماج integration الخلايا المجددة ضمن محيطها في أنسجة المضيف، ومن ثم التمايز عبر سبل شارة خلوية طبيعية. وكما وثق، فإن خلايا MSCs تمتلك القدرة لتغترس ضمن العديد من الأنسجة والأعضاء عندما تقدم للمريض بشكل جهازي، وهذا الاغتراس يبدو ثابتاً لأمد طويل. زيادةً على ذلك، يُمكن لخلايا MSCs المسرّبة إلى الدوران المحيطي أن تهاجر إلى الموقع النوعي للأذية حيث تتمايز موضعياً لترمم مكان الأذية، كما وثق ذلك في النماذج الحيوانية للكسور العظمية والفقر المخي واحتشاء العضلة القلبية⁶⁻³⁻¹⁰.

مع أن نقي العظام يشكّل حالياً مصدراً رئيساً لخلايا MSCs للدراسات البحثية والسريية، إلا أن انخفاض عدد هذه الخلايا وقدرتها على التمايز مع تقدم العمر يجعل من الممكن أن تفقد خلايا MSCs المعزولة من نقي العظام كموثوق العلاج. من جهة أخرى، اتضح مؤخراً أن نسيج الحبل السري (UC) يمكن أن يشكّل مصدراً بديلاً لخلايا MSCs المعزولة من نقي العظام، في حين أخفقت بعض الدراسات الأخرى في عزل الخلايا MSCs من دم الحبل السري (UCB)، أو أنها أظهرت تواتراً منخفضاً لتلك الخلايا في الدم¹¹⁻¹⁵. ينشأ الحبل السري في اليوم 13 من التطور الجنيني البشري من طبقة الأديم المتوسط خارج الجنينية extraembryonic mesoderm، ويحتوي الحبل السري على شريانين اثنتين ووريد واحد محاطة بنسيج سدوي stromal ضام غني بالكولاجين والسكريات البروتينية وعديدات السكريات

توالت التقارير العلمية في العقدين الماضيين التي سلّطت الضوء على أهمية الخلايا الجذعية البالغة Adult Stem Cells (ASCs) الموجودة في معظم أنسجة الجسم، مثل الخلايا الجذعية المولدة للدم hematopoietic stem cells (HSCs) والخلايا الجذعية العصبية في الدماغ neural stem cells (NSCs) والخلايا الجذعية البالغة في أنسجة أخرى كالأنسجة الشحمية والعضلية والضامة والجلد، حيث تكون هذه الخلايا غير متميزة بشكل نهائي وتتوضع بين خلايا أخرى متميزة نهائياً تقوم بوظائفها الحيوية المرتبطة بوظيفة النسيج الذي تقطن فيه¹. تمتلك الخلايا الجذعية البالغة القدرة على التجدد الذاتي المحدود بحيث تتمايز لأنواع محددة فقط من الخلايا تستطيع بواسطتها تعويض الفاقد من الخلايا المتميزة في النسيج ذاته سواء بشكل طبيعي مثل خلايا الدم ذات نصف العمر القصير نسبياً، أو بعد الجروح والأذيات النسيجية الأخرى، وهو ما يميزها عن الخلايا الجنينية embryonic stem cells (ESCs) القادرة على التمايز لأنواع خلايا الكائن الحي جميعها².

تعدّ الخلايا الجذعية الميزنشيمية أو المتوسطة mesenchymal stem cells (MSCs) والخلايا الجذعية المولدة لخلايا الدم HSCs من أهم الخلايا الجذعية البالغة، ويوجد كلا النمطين في نقي العظام (Bone Marrow (BM) لدى البالغين، حيث تشكّل الخلايا الجذعية الميزنشيمية MSCs جمهرة نادرة من الخلايا السليفة متعددة القدرات multipotent progenitors تقوم بشكل رئيس بدعم عملية التولّد الدموي hematopoiesis، لكنها تحتفظ أيضاً بكمون التمايز إلى نساقل خلوية أخرى من بينها العظمية والشحمية والغضروفية^{3,4}. وترشّح هذه الخصائص خلايا MSCs لأن تكون حجر أساس في تطوير استراتيجيات جديدة لمعالجات خلوية لأذيات الأنسجة الميزنشيمية أو

لدى بعض المتلقين للمعالجات الخلوية الغيرية، ربما بسبب تثبيطها لرد الفعل المناعي تجاه تطور الورم في أولئك المرضى. كما يبرز السؤال أيضاً هل تحافظ الخلايا MSCs المغترسة على الحالة غير المتميزة؟ وبذلك تثير السؤال عن إسهامها في المعالجة طويلة الأمد.³

اعتمدت بروتوكولات متعدّدة لتكاثر خلايا MSCs وتمايزها. وتُبدى خلايا MSCs خلال الزرع في الزجاج مظهرًا شبيهاً بخلايا الأرومات الليفية fibroblasts وتتطور إلى مستعمرات غير متناظرة بين 5-7 أيام بعد الزرع.¹¹ تتكاثر خلايا MSCs البشرية وتحفظ بقدرتها على التمايز بشكل أعظمي عند وجودها بكثافة متوسطة نسبياً، وتؤثر كثافة الزرع ليس فقط في نمو بل في شكلها morphology الخلايا أيضاً. فعندما تنمو هذه الخلايا في كثافة منخفضة أو متوسطة، تبدو بمعظمها على شكل شبيه بالمغزل، أمّا عندما تصل إلى التمادي الأعظمي maximum confluence فإنها تبدأ بتشكيل عدة طبقات. وضمن شروط مثالية، يمكن المحافظة على الخلايا MSCs في الزرع لـ 20-30 إمراراً مع احتفاظها بقدرتها على التمايز، مع وجود نحو 10% من هذه الخلايا بالأطوار S و G2 و M من الدورة الخلوية، في حين تكون معظم هذه الخلايا بالطور G0/G1.⁶ تمتلك خلايا MSCs بشكل أساسي قدرةً على التمايز إلى النسائل الميزنشيمية، كالخلايا الشحمية والعظمية والغضروفية. لكن عدّة دراسات أثبتت مؤخراً قدرة خلايا MSCs على التمايز إلى نسائل غير ميزنشيمية إذا ما زُرعت الخلايا في ظروف مناسبة، إذ أمكنها التمايز إلى خلايا قلبية أو حتى لخلايا لا تصنّف من ضمن خلايا الأديم المتوسط كالخلايا الكبدية التي تتبع للأديم الباطن endoderm، والخلايا العصبية التي تتبع للأديم الظاهر ectoderm.⁶ تبين أيضاً أن كمون التمايز يمكن أن يختلف بحسب مصدر هذه الخلايا. وتبعاً

المخاطية يدعى بهلامة وارتون Wharton's Jelly (WJ).¹¹ وقد تبين أن الخلايا السدوية التي تمتلك كموناً مهماً للتمايز في WJ تتوضع قريبةً من السطح الأمينوسي، في حين تتوضع خلايا الأرومات الليفية الأكثر تمايزاً بالقرب من أوعية الحبل السري.¹¹ وفي دراسات حديثة، بين باحثون قدرة الخلايا السدوية على التمايز إلى النسائل الميزنشيمية ذاتها التي تتمايز إليها MSCs المعزولة من نقي العظم، مثل الغضروفية والعظمية والشحمية^{13,14}، واقترح اعتماد خلايا MSCs من الحبل السري كمصدر بديل للتطبيقات السريرية للخلايا الجذعية، خاصةً أن خلايا نسيج الحبل السري تعدّ أقل نضجاً من خلايا نقي العظام بالنسبة إلى فعلها المحرض للمناعة، ومن ثم تكون هذه الأولى غير مستمنعة عندما تنقل بشكل غيري Allo- ولا تُقضي إلى رفض مناعي، وهي مفضلة عند اغتراس الخلايا الجذعية الغيري Stem Cell Allo-Transplantation.^{16,17} زيادةً على ذلك، يمكن لخلايا MSCs أن تُقرز مثبطات مناعة تسهم في التخفيف من رد الفعل المناعي لخلايا HSCs بعد اغتراس هذه الأخيرة بشكل غيري، إذ تُمكن الإفادة من اغتراس خلايا MSCs للتجديد من إعادة تولّد الدم لدى المرضى ممن يتلقون معالجات كيميائية أو شعاعية مثبّطة لنقي العظم لديهم.¹⁶ فضلاً عن ذلك كله، فإن استخدام MSCs ليس مقيداً بالقواعد الأخلاقية الصارمة كما هو الحال بالنسبة إلى الخلايا الجذعية الجنينية، كما أنّ قدرتها على التمايز إلى نسائل عديدة، وسهولة عزلها في الزجاج كونها خلايا ملتصقة adherent، فضلاً عن تأثيراتها المثبّطة للمناعة داخل العضوية، ذلك كلّها جعل من هذه الخلايا محط تركيز العديد من فرق البحوث، وأسّس لحفظ نسيج الحبل السري فضلاً عن دم الحبل السري كممارسة سريرية روتينية في بنوك الخلايا الجذعية العالمية. مع ذلك، فلخلايا MSCs سلبية أشارت إليها بعض الدراسات، وهي أنها قد تسمح بنمو الأورام

I, 10X)، والصادات الحيوية Penicillin وStreptomycin، والغلوتامين، ووسط الاستنبات الخاص بالخلايا الجذعية المتوسطة Mesencult من شركة Stem Cell Technologies الكنديّة، وتمّ الحصول على المضاد الفطري Amphotericine من شركة (Euroclone) الإيطالية، ومادتي الفورمالين وأحمر السودان من شركة Sigma الأمريكية. حصلنا على DMSO من شركة PAN الألمانية، وأطباق وفلاسكات الزرع الخلوي من شركة SPL Scientific الكوريّة. عُدَّت الخلايا باستعمال عدادة نيوبار الخلوية بوجود أزرق التريبان لتقييم العيوشية. دُرست الخلايا بالمجهر المقلوب من شركة Olympus وباستخدام كاميرا توثيق خاصّة. اشْتُرِبَت العديد من المواد الكيماوية التي استخدمت في تجارب التمايز كأدوية متوافرة في الصيدليات بشكل نقي وأضيفت تلك المواد بعد الأخذ بالحسبان التراكيز المذكورة على لصاقة الدواء. وتشمل هذه الأدوية: الأنسولين؛ والهيدروكورتيزون؛ والديكساميثازون؛ فالبروات الصوديوم. تم الحصول على الحمض الأسكوربي من شركة Stem Cell Technologies الكنديّة وعلى النيكوتيناميد من شركة Sigma الأمريكية. تم الحصول على عوامل النمو كبروتينات مأشوبة منقاة من شركة PAN الألمانية وتشمل: عامل النمو البشري (EGF) Epidermal Growth Factor، وعامل نمو الأرومات الليفية (FGF) Fibroblast Growth Factor، والفيبرونكتين Fibronectin.

عزل الخلايا الجذعية Cell Isolation:

أخذت عيّنة من الحبل السري لولادة قيصرية في مستشفى التوليد الجامعي في جامعة دمشق بعد الحصول على الموافقة المستنيرة من المرأة الحامل. نقل الحبل السري بطول ~ 20 سم ضمن وسط DMEM يحتوي على البنسيللين والستربتومايسين والأمفوتريسين والغلوتامين بتركيز عيارية، وغُسِلت مراتٍ عدّة بدائرة ملحية

لإحدى الدراسات، فإن خلايا MSCs المشتقة من الأنسجة الشحمية تمتلك القدرة لتمييز فقط إلى خلايا عظمية وغضروفية فضلاً عن الخلايا الشحمية، في حين بيّن باحثون آخرون أن لدى خلايا MSCs المعزولة من نسيج الحبل السري قدرة أكبر، ويمكنها التمايز إلى نسائل متعدّدة فضلاً عن الأنماط الخلوية الثلاثة السابقة¹¹.

وُتّق في هذه الدراسة الكمون المتعدّد للتمايز في الزجاج *in vitro* لخلايا جذعية ميزنشيمية معزولة من هلامة وارنون من نسيج حبل سري بشري، إذ بينت النتائج إمكانية تمايزها إلى خلايا شبيهة بالشحمية والعظمية والعصبية والعضلية والمنتجة للأنسولين عبر استخدام أوساط تمايز متباينة تحتوي على عدة عوامل كيميائية أو بروتينية محرّضة على التمايز النوعي. ويعتقد أن هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في سورية التي توثّق الكمون المتعدد للخلايا الجذعية الميزنشيمية المعزولة من الحبل السريّ المأخوذ من ولادة قيصرية في أحد مشافي دمشق. ويؤمل من هذه الدراسة أن تشكّل حجر الأساس لدراسات بحثية مستقبلية معمّقة في الزجاج وفي الكائن الحي، وأن تؤسس للنقائات المستخدمة في دراسات التمايز للخلايا الجذعية وتوثّق الفائدة من حفظ الخلايا الجذعية الميزنشيمية المحضّرة من نسيج الحبل السري في تطبيقات الطب التجديدي.

المواد والطرائق:

المواد والتجهيزات Materials and Equipment:

اشْتُرِبَت أوساط الاستنبات الخلوي بما في ذلك Dublicco's Modified Eagle Medium (DMEM) منخفض تركيز الغلوكوز، ووسط (IMDM)، والمصل البقري الجنيني (FBS) Fetal Bovine Serum، ومصل العجل الجنيني (FCS) Fetal Calf Serum، ودائرة الفوسفات الملحية (PBS) Phosphate Buffered Saline، وإنزيمات التريبسين (Trypsin 0.05%) والكولاجيناز (Collagenase)

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 الأزوت السائل. لفك تجميد الخلايا، أخرجت الخلايا بالإمرار الرابع من حاوية الأزوت السائل ووضعت مباشرة في حمام مائي بدرجة 37°م، وقُيِّمت عيوشية الخلايا بتلوين الخلايا بأزرق التريبان. وزعت الخلايا المعدة للزرع في وسط DMEM/10% FBS وبعد النبد، أعيدت بعثرة الخلايا في وسط Mesencult بالطريقة الموصوفة أعلاه.

تمايز الخلايا Cell Differentiation:

التمايز الشحمي Adipogenic:

بُذرت الخلايا بتركيز (2.5 X 310/بئر) في طبق استنبات خلوي يحتوي 96 بئراً. بعد مضي 24 ساعة، غُسِلت الخلايا في كل بئر بدائرة PBS، ثم أُضيف وسط {DMEM/10% FBS} إلى الخلايا الشاهدة، أو أُضيف الوسط المحرّض لتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا شحمية من شركة Euroclone الإيطالية (hMSC adipogenic differentiation kit). دامت مدة حضانة الخلايا في وسط الاستنبات المحرّض على التمايز أسبوعين مع تغيير وسط الزرع كل 3-4 أيام، وجرت مراقبة شكلية الخلايا مجهرياً. في اليوم الخامس عشر، لُوِّتت الخلايا بأحمر السودان، حيث غُسِلت الخلايا بدائرة PBS مرتين، ثم أُضيف حجم قدره 100 مكل من محلول الفورمالين إلى كل بئر، وجرى تثبيت الخلايا مدة نصف ساعة داخل خيمة العزل. في الخطوة التالية، غُسِلت

فوسفاتية (PBS)، وحقن هذا المحلول ضمن نسيج الحبل عدة مرات للتخلص من بقايا الخثرات المتشكلة خلال الاعتيان. جُرِّت قطع الحبل السري إثر ذلك إلى قطع بأبعاد لا تتجاوز 1 سم، ووزعت في آبار طبق استنبات ذي 12 بئراً وحضنت في وسط الاستنبات DMEM الخالي من المصل والحواوي على (10%) من إنزيم الكولاجيناز 1 Collagenase I. وحُضِنَت العيّات (نحو 18 ساعة) في هذا الوسط، وفي نهاية مدة الحضنة مع الكولاجيناز، جُمِعَ السائل الطافي من الآبار وجمعت الخلايا المتحررة من نسيج الحبل السري بالنبد بسرعة 1200 دورة/دقيقة مدة 5 دقائق، وبعثرت في وسط DMEM الحاوي على 20% من المصل FBS، وحُضِنَت الخلايا في هذا الوسط مدة 48 ساعة. لاحقاً لذلك، أُزيلت الخلايا غير الملتصقة واستبدل وسط DMEM/20% FBS بوسط الاستنبات الخاص (Mesencult MSCs) الحاوي على السيتوكينات اللازمة لنمو الخلايا الجذعية المتوسطة وتكاثرها. بُدِّلَ الوسط Mesencult كل ثلاثة إلى أربعة أيام، إلى حين وصول الخلايا إلى حد التمايز confluence المقارب لنسبة 80-90%، حيث نزلت الخلايا الملتصقة بمعاملتها بإنزيم التريبسين (0.05%) مدة 5 دقائق بدرجة حرارة 37°م. أُضيف بعد ذلك وسط DMEM الحاوي على 10% من المصل لتنشيط إنزيم التريبسين، 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 الإمرات اللاحقة للخلايا.

حفظ الخلايا بالتجميد Cryopreservation والزرع اللاحق

لعملية التجميد:

أضيف إنزيم التريبسين (0.05%) إلى الخلايا الملتصقة مدة 5 دقائق، وبعثرت الخلايا المنفصلة عن السطوح البلاستيكية في وسط DMEM/10% FBS، ومن ثم نبذت

للحظي real-time PCR بوجود خليط نكليوتيدي موسوم بصباغ SYBERGreen المفلور وإنزيم بوليميراز الدنا ومرئسات نوعية للمورثات المستهدفة، وهذه العتائد جميعها هي من شركة Thermo/Fermentas الأمريكية. قُورِنَتِ الزيادة في الفلورة الناجمة عن تشكّل نواتج التفاعل بجهاز القياس اللحظي من شركة Spartan الكندية. استخدمت المرئسات المبينة في الجدول التالي التي صمّمت عبر برنامج PRIMER3 وصنّعت من قبل شركة VPN الألمانية، لمضاعفة المورثات:

المورثة	المرئستان الأمامية والخلفية
GAPDH	For 5`-ggcctccaaggagtaagacc-3` Rev 5`-aggggtctacatggcaactg-3`
VDR	For 5`-gccaccataagacctacga-3` Rev 5`-agattggagaagctggacga-3`
cKit	For 5`-tgacttacgacagctcgtg-3` Rev 5`-ccactggcagctacagaagca-3`
Oct4	For 5`-cgtgagaggcaacctggaga-3` Rev 5`-acactcgaccacatccttc-3`

التمايز العصبي Neurogenic:

بُذرت الخلايا بتركيز (2.5 X 310/بئر) في طبق استنبات خلوي يحتوي 96 بئراً. بعد مضي 24 ساعة، غُسِلَتِ الخلايا في كلِّ بئرٍ بدائرة PBS، ثم أُضيف وسط {DMEM/10% FBS} إلى الخلايا الشاهدة، أو أُضيف الوسط المحرّض لتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا عصبية {DMEM/F12/10% FCS} الحاوي على 20 نانوغراماً/مل من عامل النمو البشري EGF، و 20 نانوغراماً/مل من عامل النمو للأرومات الليفية FGF و 60 ميكرومولاً/ل من فالبروات الصوديوم، و 5 ميكرومول/ل أنسولين و 5 ميكروولتر بيتا ميركابتو إيثانول β ME و 1 مكرومول/ل هيدروكورتيزون}. جدّد وسط التمايز العصبي مرة واحدة بعد ثلاثة أيام والتقطت صور الخلايا الشبيهة بالخلايا العصبية عبر كاميرا المجهر المقلوب بعد أسبوع من بدء التمايز.

الخلايا عدة مرات بالماء المقطر، وأضيف 100 مكل من الإيزوبروبانول بتركيز 60%، وحضنت الخلايا مدة 5 دقائق. بعد إزالة الإيزوبروبانول، أُضيف 100 مكل من محلول أحمر السودان في مزيج من الإيزوبروبانول والماء (بنسبة 2:3)، وحضنت الخلايا مدة 5 دقائق أُزِيلَ إثرها أحمر السودان بغسل الخلايا بالماء المقطر بلطف حتى الحصول على غسولٍ خالٍ من اللون الأحمر، وجرى أخيراً توثيق وجود قطيرات الزيت التي أبدت تلويناً إيجابياً بأحمر السودان في الخلايا المتميزة باستخدام المجهر المقلوب المجهز بكاميرا رقمية.

التمايز العظمي Osteogenic:

بُذرت الخلايا بتركيز (2.5 X 310/بئر) في طبق استنبات خلوي يحتوي 96 بئراً. بعد مضي 24 ساعة، غُسِلَتِ الخلايا في كلِّ بئرٍ بدائرة PBS، ثم أُضيف وسط {DMEM/10% FBS} إلى الخلايا الشاهدة، أو أُضيف الوسط المحرّض لتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا عظمية من شركة Euroclone الإيطالية (hMSC osteogenic differentiation kit). بعد ثلاثة أسابيع جدّد خلالها وسط التمايز كل 3-4 أيام، جُرِنَتِ الخلايا إلى قسمين استخدم أحدهما للتلوين بكاشف فون كوسا (نترات الفضة) والآخر لاستخلاص الرنا الكلي من الخلايا المتميزة. اتّبع بروتوكول معياري للتلوين، حيث غُسِلَتِ الخلايا بدائرة PBS عدة مرات ثم نُبِتَت بالفورمالين 10% مدة نصف ساعة، ومن ثم غُسِلَت عدة مرات بالماء المقطر ومن ثم أُضيف محلول نترات الفضة 5% وعرضت الخلايا للأشعة فوق البنفسجية داخل خيمة العزل مدة 30 دقيقة. غسلت بعدها الخلايا والتقطت الصور بكاميرا المجهر المقلوب. أمّا القسم الثاني من الخلايا فحُضِع لاستخلاص الرنا الكلي total RNA، ومن ثم صُنِعَ الدنا المتمم cDNA بوجود عديد من ديوكسي ثايميدين dT، ومن ثم أُجرى تفاعل البوليميراز التسلسلي

التمايز العضلي Myogenic:

بُذرت الخلايا بتركيز (2.5 X 310/بئر) في طبق استنبات خلوي يحتوي 96 بئراً. بعد مضي 24 ساعة، غُسِلَت الخلايا في كل بئر بدائرة PBS ثم أُضيف وسط {DMEM/10% FBS} إلى الخلايا الشاهدة، أو أُضيف الوسط المحرّض لتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا عضلية {DMEM/F12/10%FBS} الحاوي على 1 ميللي غرام/مل أنسولين و100 نانومول/ل من الحمض الأسكوربي و1 ميللي مول/ل من الديكساميثازون}. جُدّد وسط التمايز العضلي مرة واحدة بعد ثلاثة أيام والتقطت صور الخلايا الشبيهة بالخلايا العضلية عبر كاميرا المجهر المقلوب بعد أسبوع من بدء التمايز.

التمايز إلى الخلايا المنتجة للأنسولين IPCs:

بُذرت الخلايا بتركيز (2.5 X 310/بئر) في طبق استنبات خلوي يحتوي 96 بئراً. بعد مضي 24 ساعة، غُسِلَت الخلايا في كل بئر بدائرة PBS ثم أُضيف وسط {DMEM/10% FBS} إلى الخلايا الشاهدة، أو أُضيف الوسط المحرّض لتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة إلى خلايا منتجة للأنسولين (IPCs) Insulin Producing Cells {DMEM hi glucose/10% FCS} الحاوي على 5 مكروغرام/مل فيبرونكتين و 5 ميللي مول/ل من النيكوتيناميد}. جُدّد وسط التمايز إلى خلايا منتجة للأنسولين مرة كل ثلاثة أيام والتقطت صور الخلايا عبر كاميرا المجهر المقلوب بعد عشرة أيام من بدء التمايز. لقياس تركيز الأنسولين البشري في السائل الطافي، استبدل وسط الزرع لكل من الخلايا الشاهدة والتمايزة بوسط DMEM يحتوي على 2% فقط من مصل FBS، وحضنت الخلايا مدة 24 ساعة، ثم حُضرت جُميعة من وَسَطِي الحُضن للخلايا الشاهدة والتمايزة، كل على حدة، وقيس تركيز الأنسولين في كل من الجُميعتين بواسطة

عتيدة الامتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم من شركة Diametra الإيطالية بحسب الإرشادات المرفقة بالعتيدة.

النتائج:

عيوشية الخلايا المجددة وزمن التضاعف doubling

time:

وُصِفَت بروتوكولات العزل والتتميط المناعي للخلايا الجذعية الميزنشيمية المعزولة من نسيج الحبل السري في دراسة سابقة (20)، حيث زُرعت الخلايا في أوساط الزرع الحاوية على عوامل نمو تمايز الخلايا وتثبيتها في الزجاج. وقد أبدت هذه الخلايا أنماطاً مناعية تتناسب ونواتج العديد من البحوث السابقة التي نمّطت هذه الخلايا (20). وبعد الوصول إلى الإمرار الرابع للخلايا في الزجاج، حُفِظ قسم من الخلايا في الأزوت السائل في وسط الزرع الحاوي على 10% مصل و10% DMSO، ومن ثم أُجريت التجارب جميعها في هذه الدراسة على خلايا حُفِظت في الأزوت السائل مدة تزيد على ستة أشهر.

أظهرت الخلايا التي حُفِظت في الأزوت السائل بعد الإمرار الرابع عيوشية راوحت بين 80-90%، مما يدل على كفاءة بروتوكول التجميد الذي اعتمد على تمديد معلق الخلايا في وسط الزرع بمحلول وسط الزرع الحاوي على 20% من DMSO، وبحيث لا تُصافُ مادة DMSO بشكل مباشر إلى الخلايا مما قد يفقدها بعضاً من عيوشيتها. كما أبدت الخلايا قابلية للنمو والتكاثر شبيهة بالخلايا قبل التجميد وبزمن تضاعف doubling time بلغ 3-4 أيام في الطور اللوغارتمي للنمو، وهو مطابق لزمن تضاعف الخلايا في الإمرات 3 و 4 السابقة لعملية التجميد. كما بدت الخلايا بشكل مغزلي مميز للخلايا الجذعية الميزنشيمية (الشكل 1).

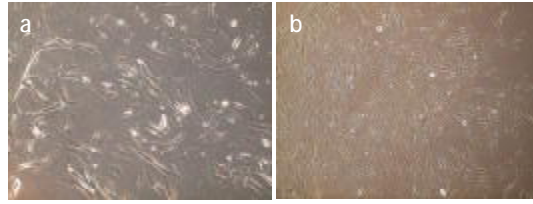
باللون الأحمر، في حين بقيت سيتوبلازما الخلايا الشاهدة جميعها دون تلوين، مما يدعم تحول الخلايا الجذعية الميزنشيمية إلى خلايا شبيهة بالخلايا الشحمية. وتتوافق هذه النتيجة مع العديد من الدراسات التي بينت قدرة خلايا MSCs على التمايز إلى خلايا شحمية تتجمع فيها حويصلات ملأى بقطيرات الدسم¹¹⁻¹³.

التمايز إلى خلايا شبيهة بالخلايا العظمية Osteocyte-like cells

ظهر تبدل شكلية الخلايا المزروعة في الوسط المحرّض على التمايز العظمي بعد 10 أيام من بدء الزرع، في حين لم يطرأ تغيير يذكر على شكلية الخلايا الشاهدة (الشكل 3). وظهرت الخلايا المتميزة بشكل خلايا مستطيلة مُصطَفة إلى جانب بعضها بعضاً بشكل ملحوظ، كما لوحظ البدء في تشكيل الخلايا لطبقات، وهو مظهر مميز للخلايا العظمية في أوساط الزرع (الشكل 3، a و b). وللتأكد من نمط التمايز الذي طرأ على هذه الخلايا، أُجري تلوين فون كوسا لكل من الخلايا الشاهدة والمتميزة، إذ لوحظ تكدّس في اللون الأسود فوق بعض الخلايا المتميزة، في حين لم يلاحظ التكدّس نفسه في آبار الخلايا الشاهدة (الشكل 3، c و d).

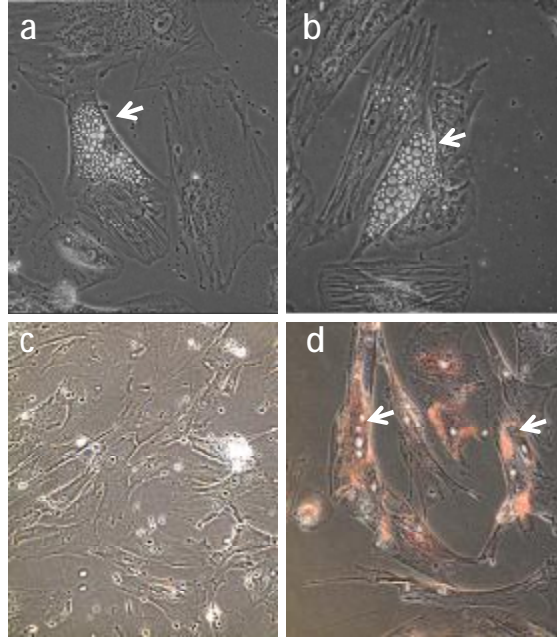
التمايز إلى خلايا شبيهة بالخلايا الشحمية-Adipocyte like cells

بعد تطبيق الوسط المحرّض للتمايز الشحمي بأسبوع، بدأت شكلية بعض الخلايا بالتحول من الشكل المغزلي النمطي للخلايا الجذعية الميزنشيمية إلى خلايا مسطّحة، ولوحظ بدء تشكّل حويصلات



الشكل 1: شكلية الخلايا الجذعية الميزنشيمية بالمجهر المقلوب بعد زرعها اللاحق للتجميد في الأزوت السائل. (a) الخلايا في تمادي -40% وبتكبير X150. (b) نمو الخلايا بتمادي -80% وتكبير X60.

متلاصقة ملأت سيتوبلازما الخلية (الشكل 2، a و b)، في حين لم يطرأ تغيير يذكر في شكلية الخلايا الشاهدة. وللتأكد من المحتوى الشحمي لهذه الحويصلات، لُوّنت الخلايا الشاهدة والمتميزة بأحمر السودان الذي يلوّن القطرات الشحمية. ويبيّن الشكل 2 (c و d) إيجابية التلوين فقط لدى الخلايا المزروعة في الوسط المحرّض على التمايز، حيث تلوّنت سيتوبلازما العديد من الخلايا



الشكل 2: تحريض تمايز MSCs إلى خلايا شبيهة بالخلايا الشحمية. (a و b) شكلية بعض الخلايا المتميزة، وتبدو الحويصلات داخل سيتوبلازما تلك الخلايا (الأسهم)، التكبير X300. (c و d) تلوين أحمر السودان الذي أظهر إيجابية فقط في الخلايا المتميزة d وليس في الخلايا الشاهدة c، التكبير X150.

البلاستيكية لأطباق الزرع، إذ بدت الخلايا المتميزة أشبه بالكرات المتجمعة، وفي بعض الأحيان أمكن تمييز بنية شبيهة بالقنوات تصل بين كتل الخلايا (الشكل 4، a و b) التي بدت واضحة خاصة في التكبير X300 (الشكل 4 c)، وهو ما يتفق مع نتائج دراسات أخرى حديثة وثقت قدرة خلايا MSCs على التمايز لخلايا شبيهة بالخلايا الغدية ومنتجة للأنسولين²⁴⁻²⁶. أظهرت نتائج الإليزا لكل من جميعتي الخلايا الشاهدة والمتميزة زيادة في تركيز الأنسولين في جميعة السائل الطافي للخلايا المتميزة بلغت نحو 3.5 ضعف تركيز الأنسولين في جميعة الخلايا الشاهدة.

التمايز إلى خلايا شبيهة بالخلايا العضلية:

طراً التبديل على شكلية الخلايا الجذعية في الأيام 3-5 بعد إضافة وسط التمايز. بدت معظم الخلايا المتميزة بشكل طولاني ومتجمعة بشكل حزم، كما أظهر العديد من الخلايا بنية الأنبوب العضلي myotube المميزة لتمايز

فضلاً عن ذلك، قيس التعبير الجيني بواسطة تفاعل البوليميراز التسلسلي الكمي واللحظي RT-qPCR على مستوى الرنا المرسال لعدد من المورثات في كل من الخلايا الشاهدة والمتميزة. أظهرت النتائج انخفاضاً في التعبير عن مورثتي Oct-4 و cKit (زيادة في عتبة الدورة cycle threshold Ct) وارتفاعاً في التعبير عن مورثة VDR (انخفاض في Ct) في الخلايا المتميزة نسبةً إلى الخلايا الشاهدة، في حين تساوى التعبير عن مورثة GAPDH الخدمية housekeeping الشاهدة في كل من جمهورتي الخلايا المتميزة والشاهدة (الشكل 3، e و f).

التمايز إلى خلايا منتجة للأنسولين Insulin-producing Cells:

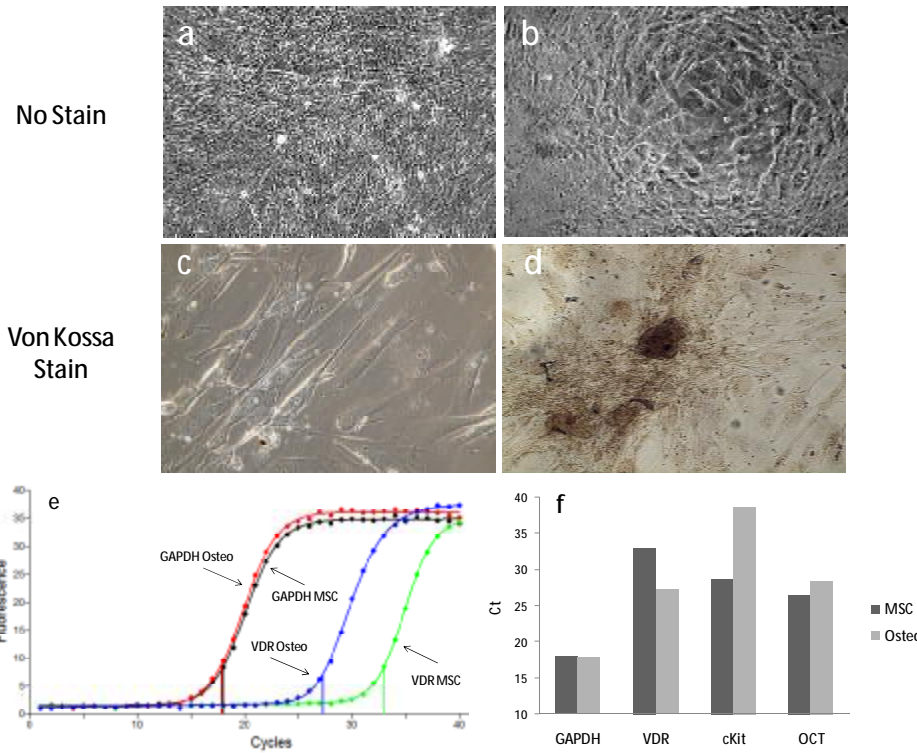
طراً تغيّر ملحوظ على شكلية الخلايا التي تعرّضت لوسط التمايز المستخدم بعد 5 أيام من إضافة وسط التمايز. وظهرت الخلايا في اليوم السابع التالي لإضافة الوسط بشكل تكتلات خلوية غير ملتصقة على السطح

حين لم تشاهد أي من البنى المتميزة في الخلايا الشاهدة خلال مدة الزرع. وبدأت الخلايا المتميزة بالشكل النمطي المميز للخلايا العصبية مع الاستطالات والتفرعات العصبونية النمطية (الشكل 6)، وهو ما يتوافق مع دراسات سابقة سواءً من حيث الزمن الضروري للتمايز أو من حيث شكلها الناتجة عنه^{29,30}.

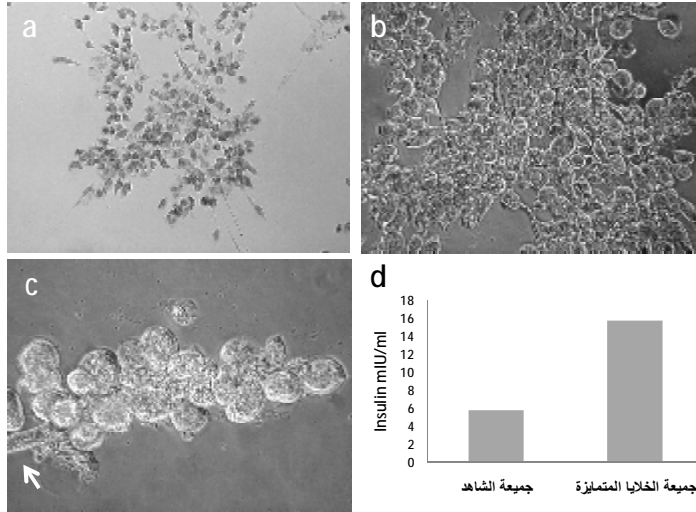
الخلايا العصبية التي تبدو بشكل نهاية مُستدقة للخلايا (الشكل 5). وهذا يتفق مع دراسات سابقة تشابهت فيها شكلها للخلايا العصبية المتميزة مع نتائج هذه الدراسة^{27,28}.

التميز إلى خلايا شبيهة بالخلايا العصبية Neuron-like Cells

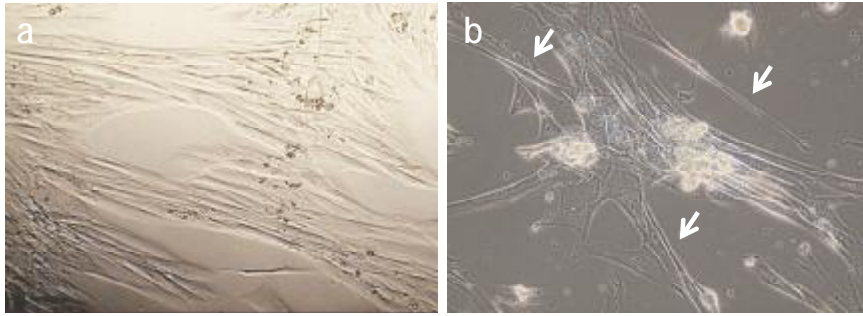
طراً التبدل في شكلها للخلايا الجذعية الميزنشيمية المتميزة في الأيام 7-10 من إضافة وسط التمايز، في



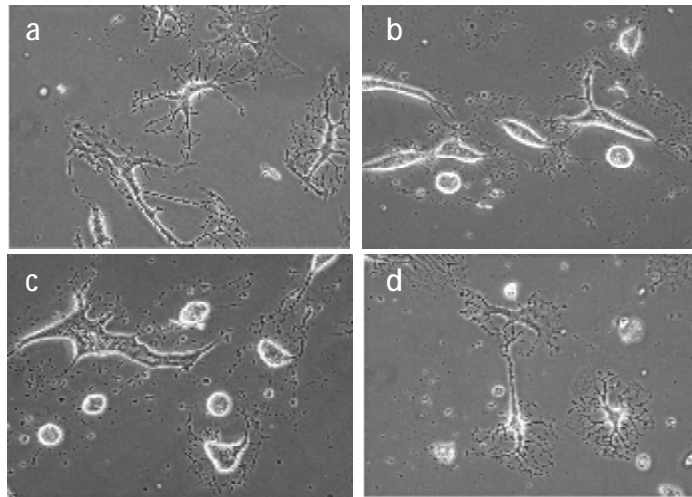
الشكل 3: تمايز الخلايا الجذعية الميزنشيمية إلى خلايا شبيهة بالخلايا العظمية. (a و b) شكلها للخلايا المتميزة وتبدو الخلايا متراصة وبشكل طبقات فوق بعضها بعضاً، التكبير X60. (c و d) تلوين فون كوسا الذي أظهر ترسبات سوداء اللون فقط في الخلايا المتميزة d بينما لم تُبدِ ترسبات تذكر في آبار الخلايا الشاهدة، التكبير X150. (e و f) تفاعل البوليميراز التسلسلي الكمي اللحظي RT-qPCR ويظهر الشكل e تزايداً سريعاً في الفلورة في عينة الخلايا المتميزة Osteo لنواتج مورثة VDR نسبةً إلى الخلايا الشاهدة MSC (مما انعكس على انخفاض في عتبة الدورة Ct)، بينما يُظهر الشكل f زيادةً في Ct لمورثتي Oct4 و cKit (انخفاضاً في التعبير) وانخفاضاً في Ct لمورثة VDR (ارتفاعاً في التعبير) في الخلايا المتميزة نسبةً إلى الخلايا الشاهدة مع بقاء التعبير عن مورثة GAPDH الشاهدة دون أي تغيير.



الشكل 4: تمايز الخلايا الجذعية الميزنشيمية إلى خلايا منتجة للأنسولين. (a و b و c) شكلية الخلايا المتمايزة بالتكبيرات X60 و X150 و X300، على التوالي. وتبدو البنية الشبيهة بالقناة في الشكل c (السهم) بحيث تتجمع الخلايا المتمايزة حولها بشكل يشبه القناة الغذائية الجامعة لإفرازات تلك الخلايا. (d) تركيز الأنسولين في كل من جميعتي السائل الطافي للخلايا الشاهدة والمتمايزة.



الشكل 5: تمايز الخلايا الجذعية الميزنشيمية إلى خلايا شبيهة بالخلايا العضلية. (a) البنية الشبيهة ببنية الخلايا العضلية في الزجاج إذ تبدو الخلايا متطاوله وبشكل حزم، التكبير X150. (b) النهايات المستدقة للخلايا المتمايزة (الأسهم)، التكبير X150.



الشكل 6: تمايز الخلايا الجذعية الميزنشيمية إلى خلايا شبيهة بالخلايا العصبية. (a و b و c و d) شكلية الخلايا المتمايزة، وتبدو البنية التمايزية النمطية للخلايا العصبية من استطالات مميزة للعصبونات، التكبير X300.

المناقشة:

تشكل خلايا MSCs وسيلة فريدة للاستخدام في الطب التجديدي، فهي تمتلك كموناً تكاثرياً قوياً وتستطيع في الوقت نفسه التمايز إلى نسائل خلوية متعددة. تؤكد مؤخرًا أن هذه الخلايا تُعزّس بنجاح لدى المرضى وتؤدي إلى تأثيرات مفيدة في العديد من النماذج الحيوانية المقلدة للأمراض والأديّات لدى البشر (3،4). ولذلك كلّه شهد العقد الأخير زيادةً مضطربةً في عدد البحوث التي هدفت إلى دراسة خواص هذه الخلايا وتكاثرها وتمايزها في الزجاج أو داخل العضوية. بدأ الاهتمام في السنوات القليلة الماضية بالخلايا الجذعية في منطقتنا، إلا أنه يمكن وصف البحوث المتعلقة بهذه الخلايا بالخجولة، إذ اقتصرَت تلك البحوث على عدد قليل جدًا من الدراسات مقارنة بالنمو المتسارع في كم الدراسات العالمية المتعلقة بهذا المجال ونوعها. وفي سورية، أعلن حديثًا عن تأسيس بنكين اثنين للخلايا الجذعية يُحفظُ فيهما دم الحبل السري بعد الولادة مباشرة، وتُخزَّنُ عينات المتبرعين بالتجميد في الأزوت السائل إلى أن يمكن الإفادة منها لاحقًا في حال حاجة المتبرع إلى خلاياه الجذعية مستقبلًا، وبشكل خاص نتيجة الإصابة بالخبائثات الدموية^{18،19}. ومع أن الاهتمام في هذين البنكين قد اقتصر -حتى الآن- على دم الحبل السري، إلا أن حفظ نسيج الحبل السري، الذي يمكن مستقبلًا من عزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية، قد أصبح أيضًا ممارسة سريرية روتينية في عدد كبير جدًا من بنوك الخلايا الجذعية حول العالم نظرًا إلى الخصائص التي تتمتع بها هذه الخلايا والطيف الواسع لكمونها العلاجي للعديد جدًا من الأديّات الخلوية والنسجية، وأيضًا لدور الخلايا الجذعية الميزنشيمية في تثبيط رد الفعل المناعي تجاه الخلايا الجذعية المولدة للدم المُعزّسة لدى مرضى الخبائثات الدموية.

تظهر نتائج هذه الدراسة كمون التمايز المتعدد للخلايا الجذعية الميزنشيمية المحفوظة في الأزوت السائل، إذ تمايزت هذه الخلايا إلى خمسة أنماط خلوية مختلفة لدى زرعها في أوساط التمايز النوعية لها. تبين سابقًا قدرة هذه الخلايا قبل التجميد على التمايز في الزجاج إلى خلايا شحمية²⁰، وأكدت الدراسة الحالية قدرة الخلايا المحفوظة بالتجميد على تمايز مماثل في الزجاج. فضلًا عن ذلك، أظهرت الخلايا المعرضة لوسط التمايز العظمي في الزجاج شكلياء شبيهة بالنسيج العظمي، ودُعِم ذلك بنتائج الـ RT-qPCR. فقد انخفض التعبير في الخلايا المتميزة عن Oct4 وهو أحد عوامل الانتساخ المهمة المسؤول عن الحفاظ على الخاصية الجذعية stemness التي تعزّز هداة quiescence الخلايا الجذعية وبقائها دون تمايز، كما انخفض التعبير عن cKit في الخلايا المتميزة، وهو مستقبل لعامل نمو الخلايا الجذعية ومهم لتكاثر الخلايا غير المتميزة. من جهةٍ أخرى، ارتفع التعبير عن الرنا المرسال لمستقبل الفيتامين د أو VDR في الخلايا المتميزة، مما يدلُّ على اكتساب هذه الخلايا لبعض خصائص الخلايا العظمية التي هي أحد أهم أنماط الخلايا المُستهدفة من قبل الفيتامين د في العضوية الحيّة. وتتفق نتائج التمايز والتلوين والتغير في التعبير الجيني مع دراسات سابقة^{11،21-23}. أظهرت الخلايا الجذعية الميزنشيمية المحفوظة بالتجميد أيضًا القدرة على التمايز إلى خلايا شبيهة بالخلايا العضلية والعصبية، وتوافقت نتائج هذه الدراسة من حيث شكلياء الخلايا المتميزة في كلتا الحالتين مع ما وثّق سابقًا في دراسات عديدة²⁷⁻³⁰. أمّا الخلايا الجذعية الميزنشيمية التي عُرّضت لوسط يحرّضها على التمايز إلى خلايا منتجة للأنسولين فقد أبدت شكلياء شبيهة بالخلايا الغدية، كما ارتفع تركيز الأنسولين المقيس مناعياً إلى أكثر من ثلاثة أضعاف في السائل الطافي للخلايا المتميزة عنه في الخلايا الشاهدة،

ويُفسّر بعض الباحثين ذلك بأنّ التمايز إلى نساقل لا تنتمي لطبقة الأديم المتوسط يحدث نتيجة إعادة برمجة خلايا MSCs بوجود بعض العوامل المنحلة الموجودة في أوساط الزرع. وتبعاً لهذه الفرضية، تتبّع خلايا MSCs آلية تدعى بمرونة الخلايا الجذعية *stem cell plasticity*، بحيث تتغيّر هذه الخلايا التزامها بالنساقل الخاصة بها، وينجم عن ذلك ظهور جمهرات من خلايا MSCs قادرة على التعبير عن مورثات تتبع لنساقل متعدّدة⁶. وتتفق نتائج هذه الدراسة مع قابلية الخلايا الجذعية الميزنشيمية للتمايز خارج النساقل الميزنشيمية المعتادة إلى خلايا عصبية، من طبقة الأديم الظاهر، وخلايا منتجة للأنسولين من طبقة الأديم الباطن. ومن الجدير بالذكر أنّ خلايا MSCs غير المتميزة بدت في وسط الزرع بشكل غير متجانس، مع وجود خلايا مختلفة الشكل والحجم²⁰. مع ذلك، فقد بدت الخلايا جميعها لكل نمط من التمايز متجانسة وتملك شكلياً متشابهة إلى حدّ بعيد. إنّ هذه النتائج ربما تدعم فرضية إعادة برمجة الخلايا التي تخضع لها الخلايا الجذعية الميزنشيمية المزروعة في الزجاج جميعها، وبشكل يتواءم مع عوامل النمو المتوفرة في الوسط والنوعية لكل نمط من أنماط التمايز.

الاستنتاج:

بيّنت نتائج هذه الدراسة إمكانية حفظ الخلايا الجذعية الميزنشيمية المعزولة من نسيج الحبل السري البشري في الأزوت السائل مدة طويلة نسبياً مع احتفاظها بنسبة عيوشية عالية، وقدرة على التكاثر شبيهة بقدرة الخلايا ذاتها قبل التجميد، وعلى التمايز إلى خمسة أنماط خلوية مختلفة تُصنّف ثلاثة منها ضمن نساقل الأديم المتوسط، وهي الشحمية والعظمية والعضلية، في حين تتبع الخلايا العصبية والخلايا المنتجة للأنسولين إلى طبقتي الأديم الظاهر والأديم الباطن، على التوالي. ويمكن عدّ هذه الدراسة، على أهميتها، دراسة أولية تبين احتفاظ الخلايا

وبشكل يتوافق مع إحدى الدراسات السابقة²⁴. ويجدر التنويه هنا إلى احتمال وجود تصالب ضعيف بين أعداد الأنسولين المستخدمة في عتيدة الإليزا مع بروتينات مصّل FBS المضاف بتركيز منخفض (2%) إلى وسط الزرع في كل من الخلايا الشاهدة والمتميزة خلال 24 ساعة قبل جمع السائل الطافي لقياس تركيز الهرمون، الأمر الذي قد يفسّر وجود مستويات أولية للهرمون حتى في السائل الطافي للخلايا الشاهدة.

أثبتت التجارب الخلوية في العديد من النماذج الحيوانية أنّ زرع الخلايا كثيرة القدرات *pluripotent* في أوساط معيّنة، مثل خلايا ESCs، يؤدّي إلى تمايزها إلى خلايا تتدرج عادةً ضمن إحدى الطبقات الثلاث الرئيسة للقسم الأرومي *blastomere*؛ وهي الأديم الظاهر والمتوسط والباطن. أمّا الخلايا متعدّدة القدرات *multipotent*، مثل MSCs والخلايا الجذعية البالغة عموماً، فيفترض أنّ يقتصر تمايزها على عدد محدود وقليل من النساقل الخلوية³. بيّنت نتائج هذه الدراسة قدرة الخلايا الجذعية الميزنشيمية المعزولة من نسيج الحبل السري البشري على التمايز إلى خمسة أنماط خلوية مختلفة شكلياً وربما وظيفياً، كما عزّزت ذلك نتائج بعض الاختبارات المتممة التي أجريت لتلوين الخلايا وقياس التعبير الجيني سواءً على مستوى الرنا RNA، أو البروتين في حالة هرمون الأنسولين. إنّ قدرة خلايا MSCs على التمايز إلى نساقل ميزنشيمية كـالخلايا الشحمية والعظمية والغضروفية موقّعة بدقّة في العديد من الدراسات خلال العقد الماضي، وهو أمر متوقع على اعتبار أنّ النساقل الخلوية الثلاث تتحدّر جميعاً من الخلايا السليفة ذاتها المشكّلة لطبقة الأديم المتوسط، وهي الخلايا الجذعية الميزنشيمية. مع ذلك، فقد تم حديثاً تحقيق تمايز ناجح لخلايا MSCs إلى العديد من النساقل الخلوية الأخرى، متضمّنةً الخلايا العضلية والقلبية والكبدية وخلايا بيتا المعنكالية وخلايا الكلية وحتى الخلايا العصبية²¹⁻³¹.

الجدعية الميزنشيمية المجددة بخصائصها الوظيفية، وربما تشير إلى أهمية حفظ نسيج الحبل السري فضلاً عن دم الحبل السري في بنوك الخلايا الجذعية في سورية، الأمر الذي أظهرته دراسات عديدة عالمية حول قابلية ومُعوّلية عزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية من نسيج الحبل السري قبل التجميد أو بعده، واستخدامها في الممارسات المتعددة للطب التجديدي. وهناك بصورة عامة حاجة ماسة للقيام

بعدد من الدراسات اللاحقة في سورية تهدف إلى عزل الخلايا الجذعية الميزنشيمية من نسيج الحبل السري أو دمه المحفوظ بالتجميد والتأكد من احتفاظ الخلايا المعزولة من أيّ منهما بقدرتها الوظيفية على التكاثر والتميز إلى النسائل الخلوية المتعددة التي تشكل حجر الأساس لمعالجات خلوية مستقبليّة.

References

1. Trounson A. (2009) New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Medicine*, 7(29): 1-5.
2. Helmy KY, Patel SA, Silverio K, Pliner L, and Rameshwar P. (2010) Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *The Deliv*, 1(5): 693-705.
3. Sensebe, L., Krampera, M., et al. (2010) Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*; 98: 93-107.
4. Keating, A. (2012) Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, V.10, pp. 709-716.
5. Law S, and Chaudhuri S. (2013) Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *Am J Stem Cell*; 2(1): 22-38.
6. Bobis, S., Jarocho, D., and Majka, M. (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histological Et Cytobiological*; V.44, pp. 215-230.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Bieback K, Kern S, Klter H, and Eichler H. (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22: 625-634.
15. 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.
16. Le Blanc, K., and Ringde, N. (2007) Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Internal Medicine*, V.262, pp. 509-525.
17. 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.
18. Al-Assad University Hospital Stem Cell Bank: <http://www.auhd.edu.sy/330.html>
19. Maatouk Stem Cell Bank (MSCB): <http://mscb-sy.com/index.php/en/>
20. Aljamali MN, Youssef L, and Uqla S. (2012) Isolation, phenotyping, and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells (UCMSCs). Accepted for publication in *Journal of Basic Sciences of Damascus University*.
21. Kim S, Min Wk, Chun S, et al. (2010) Protein expression profiles during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Tohoku J Experimental Medicine*; 221: 141-150.

22. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, et al. (2007) Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*; 8: 70.
23. Wang J, Ye F, Cheng L, et al. (2009) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promoted by overexpression of connective tissue growth factor. *J Zhjan Univ Sci B*; 10(5): 355-367.
24. Hong-wu W, Li-min L, et al. (2011) Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J*; 124(10): 1534-1539.
25. Gabr MM, Zakaria MM, et al. (2012) Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplantation*.
26. Anzalone R, Iacono ML, Loria T, et al. (2011) Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type I diabetes. *Stem Cell Rev & Rep*; 7: 342-363.
27. Gang EJ, Jeong JA, et al. (2004) Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*; 22: 617-624.
28. Grabowska I, Brozoska E, et al. (2012) Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell Transplantation*.
29. Bae KS, Park JB, Kim HS, et al. (2011) Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*; 52(3): 401-412.
30. Singh SP, Tripathy NK, and Nityanand S. (2013) Comparison of phenotypic markers and neural differentiation potential of multipotent adult progenitor cells and mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*; 5(2): 53-60.
31. 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.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2013/9/5.

تاريخ قبوله للنشر 2013/12/11.