



جامعة دمشق

كلية العلوم

قسم علم الحياة الحيوانية

عزل الخلايا الجذعية المؤلدة للدم من الحبل السري وتنميتها وتحريض تمايزها
إلى بالعات كبيرة

*Isolation And Immunophenotypical Characterization Of
Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem
Cells And Inducing Their Differentiation Toward
Macrophages.*

إعداد الطالبة

رناد القادري

المشرف المشارك

الدكتور مجد الجمالي

المشرف الرئيس

الدكتورة سعاد العقلة

Dedication and Acknowledgment

إهداء وشكر

بعد أن أتممت بحثي هذا، يطيب لي أن أشكر كل من دعمني بجهد ووقت وعلى رأسهم **الدكتورة المشرفة سعاد العجلة** التي لم تبخل علي بقراءة ومتابعة البحث والعمل على الرسالة.

وكل الشكر والتقدير لأستاذي الكريم **الدكتور محمد الجمالي** على مشاركته الإشراف وتقديمه كل الدعم والإرشاد لإتمام العمل.

والشكر لأساتذتي في كلية العلوم الذين ساهموا في تحكيم البحث ولم يخلوا بإغناؤه أدبياً وإثرائه علمياً **الدكتور حسن ناصر الدين والدكتور محمود قويدر**.

وأستاذي في القسم ومخبر الدراسات العليا **الدكتور هادي سكرية** لكل الدعم والتعاون العلمي والتشجيع لمواصلة البحث ولتوجيهاته القيمة.

ولابد من شكر السيد **الدكتور إبراهيم عثمان** المدير العام لهيئة الطاقة الذرية للسماح لي بالتدريب على تقانة الفلوسايتومتري في مخبر **الدكتور محمدان اختيار** وكل التقدير والاحترام للسيد **محمد المصعب الجبوري** الذي أشرف على تدريبي عملياً وعلمياً ولم يبخل علي بأي مساعدة وتعاونه الكبير في الرد على جميع تساؤلاتي وتوجيهي للأفضل والأنسب في مسيرة العمل البحثي وكتابة البحث.

كما أتقدم بالشكر **لمهدي التوليد وأمراض النساء الجامعي** من (إدارة، وكادر وطاقم طبي في قسم المخاض من أطباء وممرضين وعاملين) اللذين أبدوا الكثير من التعاون أثناء تطبيق وإجراء البحث.

كما أتقدم بالشكر لإدارة **الهيئة العامة للتقانة الحيوية** للسماح لي بإنجاز الجزء اللازم من العمل على البحث في مخبر التقانات الحيوية المناعية والصيدلانية وتقديم كل ما أمكن من العون.

كما أشكر **جزيل الشكر إدارة بنك الدم الجامعي** لتعاونه في تأمين أكياس الدم العقيمة لجمع عينات البحث والعمل عليها.

كما أشكر كل أساتذتي اللذين قاموا بتدريسي ونهلت من علومهم، وكل من دعمني لإتمام بحثي وهم كثر زملائي وزميلاتي في مخبر الدراسات العليا.

وأخيراً لابد من أن أشكر أهلي وأخوتي وجميع أصدقائي وصديقاتي

فهرس الأشكال

رقم الصفحة	الشكل
6	الشكل (1-2): مخطط تكوّن خلايا الدم.
20	الشكل (1-3): مبدأ الفصل المغناطيسي المناعي للخلايا $CD34^+$.
21	الشكل (2-3): شكل ترسمي يوضح المعقد الناتج عن ربط الأضداد رباعية الجزيئات للخلايا التي لا تحمل الواسمة $CD34$ من جهة و لخلايا الدم الحمر من جهة أخرى.
22	الشكل (3-3): مخطط يوضح طريقة الإغناء بالخلايا $CD34^+$ ، باستعمال عتيدة تحتوي مزيج للإغناء الأولي بالخلايا $CD34^+$ من دم الحبل السري البشري، ومن ثم فصلها حسب كثافتها بالنبذ على وسط فيكول تركيزه 1.077 غرام/ ميلي لتر.
24	الشكل (3-4): مخطط يوضح مراحل تنقية الخلايا الجذعية المؤددة للدم $CD34^+$ بطريقة العزل المغناطيسي المناعي لفصل الخلايا بالانتقاء الإيجابي.
25	الشكل (3-5): شكل ترسمي يوضح معقد الأضداد ثنائية النوعية رباعية الجزيئات التي تربط خلايا لا تحمل الواسمة $CD34$ من جهة والدكستران المُغلف للحبيبات المُمَغَنَظَة من جهة أخرى.
26	الشكل (3-6): مخطط يوضح مراحل تنقية الخلايا الجذعية المؤددة للدم $CD34^+$ بطريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي.
28	الشكل (3-7): مخطط ترسمي لحجرة الجريان في جهاز قياس الجريان الخلوي.
45	الشكل (1-4): صورة تظهر الطبقة المُكوّنة من الخلايا وحيدة النواة $MNCs$ ، المعزولة بنبذ الغلالة البيضاء على وسط الفيكول.
46	الشكل (2-4): تمثيل بياني نقطي للمكونات الخلوية لطبقة الخلايا وحيدة النواة، تُبين الأنماط الخلوية المختلفة المكونة لدم الحبل السري ومكان توضعها على محوري التبعر الأمامي FSC (الحجم) والتبعر الجانبي SSC (التحبيب).

48	الشكل (4-3): تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS و SSC تشير إلى الإغناء بالخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34.
49	الشكل (4-4): تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS و SSC تبين الإغناء بالخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34 خلال مراحل المختلفة من عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الايجابي المعدل.
50	الشكل (4-5): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34+ خلال مراحل العزل المختلفة.
52	الشكل (4-6): تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS و SSC تبين الإغناء بالخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ خلال مراحل المختلفة من عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي.
53	الشكل (4-7): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34+ خلال مراحل العزل المختلفة.
56	الشكل (4-8): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34+CD45+ بعد عزلها بإحدى طريقتي الانتقاء المناعي الايجابي المعدلة (أ) أو الانتقاء المناعي السلبي (ب).
57	الشكل (4-9): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD38.
59	الشكل (4-10): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة HLA-DR (CD34+HLA-DR).
60	الشكل (4-11): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD33 (CD34+CD33+).
61	الشكل (4-12): تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD117 (CD34+CD117+).
62	الشكل (4-13): تمثيلات بيانية نقطية تبين الفرق في النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD123 (CD34+CD123+).

63	الشكل (4-14): تمثيلات بيانية نقطية تبين الفرق في النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD105 (CD34 ⁺ CD105 ⁺).
65	الشكل (4-15): تمثيلات بيانية نقطية أشارت إلى غياب المستضدات السطحية الدالة على وجود أنماط خلوية غير مرغوب بعزلها.
69	الشكل (4-16): تمثيل بياني خطي يشير إلى أثر نوع المصل على انقسام وعدد الخلايا الكلي خلال مراحل الاستنبات بعد عزل الخلايا.
71	الشكل (4-17): مخطط بياني خطي يشير إلى أثر نوع المصل على عدد مرات الزيادة في العدد الأولي للخلايا الجذعية المستنبطة بعد عزلها.
73	الشكل (4-18): أثر العامل إنترلوكين-6 في تحفيز انقسام الخلايا المعزولة.
75	الشكل (4-19): أثر العامل إنترلوكين-6 في تحفيز انقسام الخلايا المعزولة.
76	شكل (4-20): تمثيلات بيانية نقطية توضح تمايز الخلايا المستنبطة.
77	شكل (4-21): تمثيلات بيانية نقطية توضح فقدان التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية بعد عزل الخلايا واستنباتها.
78	الشكل (4-22): مخططات أعمدة توضح أثر نوع المصل في صون التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم (المعزولة بالطريقة الإيجابية) خلال استنبات الخلايا وتحريضها على التمايز.
79	الشكل (4-23): مخططات أعمدة توضح أثر نوع المصل في صون التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم (المعزولة بالطريقة السلبية) خلال استنبات الخلايا وتحريضها على التمايز.
81	الشكل (4-24): النمط المناعي لخلايا الشاهد السلبي المتميزة.
82	الشكل (4-25): تمثيلات بيانية خطية توضح أثر نوع المصل المضاف إلى وسط الاستنبات في توجيه تمايز الخلايا بالإضافة إلى أثر وجود أو غياب العامل إنترلوكين-6.
83	الشكل (4-26): أثر غياب العامل إنترلوكين-6 في تمايز الخلايا المستنبطة وانخفاض التعبير عن المستضدات السطحية المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم.

84	الشكل (4-27): أثر غياب العامل انترولوكين -6 في تمايز الخلايا المستنبطة وانخفاض التعبير عن المستضدات السطحية المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم.
85	الشكل (4-28): يشير إلى انخفاض حيوية الخلايا التي حفظت بالبرودة.
86	الشكل (4-29): مخطط أعمدة للنسب المئوية لحيوية الخلايا المقدر بتلوين الخلايا الميتة بالصباغ المتألق بروبيديوم أيودايد.
87	الشكل (4-30): تتبع لمراحل استنبات (نمو وانقسام وتمايز) الخلايا الجذعية المولدة للدم.
89	الشكل (4-31): استجابة الخلايا الأكثر بدئية المعزولة بطريقة الانتقاء السلبي وتعبيرها عن المستضد CD14 بشكل أكبر من الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء الإيجابي.
90	الشكل (4-32): (أ): الخلايا المتميزة مثبتة وملونة بملون غيمزا وغير مخموجة بطفيلي اللشمانيا. (ب): خلايا متميزة معالجة بعوامل النمو والتمايز يبدو ضمنها طفيلي اللشمانيا في طور الـ Amastigote وبعدد كبير بالمقارنة مع الخلايا في الشكل (ج): المتميزة وبداخلها الطفيلي لكن بعدد أقل ضمن الجسم الحال، الخلايا مثبتة وملونة بملون غيمزا تحت المجهر المقلوب تكبير X400.
92	الشكل (4-33): تمثيلات هستوغرام تعبر عن الشدة التأكسدية للخلايا المحرّضة بكل من المحرضات E.coli و FMLP و PMA بالمطابقة مع الشاهد.

فهرس الجداول

رقم الصفحة	الجدول
30	الجدول (3-1): قائمة بالأضداد وحيدة النسيلة المستعملة للتثمين المناعي للخلايا المعزولة ونوع الصبغة التألقية المقرونة بالضد والشركة المنتجة.
31	الجدول (3-2): الأصبغة التألقية المقرونة بالأضداد المستعملة في التثمين المناعي
40	الجدول (3-3): قائمة بالأضداد وحيدة النسيلة المستعملة للتثمين المناعي للخلايا CD34+ أثناء تمايزها إلى خط وحيّات النوى-البالعات الكبيرة، ونوع الصبغة التألقية المقرونة بالضد والشركة المنتجة.
51	الجدول (4-1): مقارنة نتائج الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ بين الطريقة التقليدية والطريقة المعدلة.
54	الجدول (4-2): مقارنة نتائج الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ في الطريقة المعدلة بنتائج الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي.
64	الجدول (4-3): مقارنة النسب المئوية لتحت المجموعات الخلوية للخلايا الجذعية CD34+ بين طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي المعدلة وطريقة الانتقاء السلبي.
66	الجدول (4-4): مقارنة النسب المئوية للأنماط الخلوية المراد استنفاذها والتي بقيت مرافقة للخلايا الجذعية CD34+ التي عزلت بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي أو الإيجابي.
91	الجدول (4-5): النسب المئوية للخمج والشدة الإخماجية للخلايا المعزولة بكلتا طريقتي الانتقاء السلبي والإيجابي.
93	الجدول (4-6): النسبة المئوية لتفلور المداد دهيرورودامين الذي يعكس الشدة التأكسدية والنشاط الأنزيمي في الجسيمات الحالة للخلايا المتميزة.

فهرس المحتويات

رقم الصفحة	العنوان
	الملخص العربي والكلمات المفتاحية للبحث
1	1. المقدمة
3	2- الدراسة المرجعية
3	2-1. تصنيف الخلايا الجذعية
5	2-2. الخلايا الجذعية المولدة للدم
5	2-2-1. تكون الخلايا الدموية ومنشأ الخلايا الجذعية المكونة للدم لها
8	2-2-2. ازدياد الخلايا الجذعية المولدة للدم
10	2-2-3. صفات الخلايا الجذعية المولدة للدم في دم الحبل السري
14	2-2-4. تنميط الخلايا الجذعية المولدة للدم
14	2-2-4-1. الواسمات الغشائية المميزة للخلايا الجذعية
15	2-2-4-2. عزل الخلايا الجذعية المولدة للدم
16	2-3. أهداف البحث
17	2-4. أهمية البحث
18	3. المواد والطرائق
18	3-1. عينات دم الحبل السري البشري
18	3-2. تحويل عينات دم الحبل السري إلى غلالة بيضاء
19	3-3. الانتقاء المغناطيسي المناعي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34 ⁺
20	3-3-1. الانتقاء الإيجابي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34 ⁺
20	أولاً-الإغناء الأولي للخلايا CD34 ⁺
21	ثانياً-فصل الوحيدات البشرية
23	ثالثاً-تنقية الخلايا CD34 ⁺
24	3-3-2. الانتقاء السلبي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34 ⁺

26	3-4. تقييم حيوية الخلايا وعددها
27	3-5. تنميط الخلايا بتقنية قياس الجريان الخلوي
28	أولاً-مبدأ التقنية
28	ثانياً-الأضداد وحيدة النسيلة المستعملة في التنميط
31	ثالثاً-الشواهد
32	رابعاً-تحضير العينات
33	خامساً-معايرة جهاز قياس الجريان الخلوي وضبط جودته
33	سادساً-تمرير العينات في جهاز قياس الجريان الخلوي
34	سابعاً-تحليل البيانات
35	3-6. دراسة شكل الخلايا الجذعية المولدة للدم
36	3-7. توسيع الخلايا الجذعية $CD34^+$
37	3-7-1. تقييم الزيادة في عدد الخلايا
38	3-7-2. تحليل النمط المناعي للخلايا المستنبطة
38	3-8. تحريض تمايز الخلايا الجذعية $CD34^+$ إلى خلايا خط وحيدات النوى / بالعات كبيرة
40	3-9. تجميد الخلايا الجذعية المولدة للدم وإزالة تجميدها
42	3-10. تقييم شدة الإخماج بطفيلي اللشمانيا في الخلايا المتميزة
43	3-11. قياس شدة الأكسدة ضمن الجسيمات الحالة في الخلايا المتميزة
44	3-12. الدراسة الإحصائية
45	4. النتائج
45	4-1. عينات دم الحبل السري البشري وعزل الخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$
45	4-1-1. عزل الخلايا وحيدة النواة MNCs
46	4-2. تقييم كفي وكمي للخلايا الجذعية $CD34^+$ المعزولة.
47	4-2-1. الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$
52	4-2-2. الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي للخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$
54	4-3. تنميط الخلايا الجذعية مناعياً بتقنية قياس الجريان الخلوي

67	4-4. استنبات الخلايا الجذعية المؤددة للدم
67	4-4-1. تقييم الزيادة في عدد الخلايا
76	4-4-2. تحليل النمط المناعي للخلايا المستنبطة
84	4-5. استنبات الخلايا الجذعية المجمدة
86	4-6. تمايز الخلايا الجذعية
86	4-6-1. دراسة شكل الخلايا خلال الاستنبات
88	4-6-2. تقييم الفعالية الوظيفية للخلايا المتميزة (البالعات الكبيرة)
89	4-6-2-1. تقييم شدة الإخماج بطفيلي الشمانيا
91	4-6-2-2. قياس شدة الأوكسدة ضمن الجسيمات الحالة
94	5. المناقشة
102	6. الاستنتاجات
103	7. التوصيات
105	8. المراجع
	الملخص الأجنبي
	قائمة بالمصطلحات العربية والاجنبية واختصاراتها
	النشرة الخارجية

المُلخَص Abstract

تُعَدُّ الخلايا الجذعيَّة المعزولة من دم الحبل السُّري أحد أهم المصادر البديلة لسلائف الخلايا المُولَّدة للدم التي تُستعمل في عمليَّات الاغتراس. وهدفت هذه الدِّراسة إلى اختبار فعاليَّة بعض الطرائق البحثيَّة في عزل الخلايا الجذعيَّة البشريَّة المُولَّدة للدم بُغية تحسين مردود وحيويَّة نائل الخلايا $CD34^+$ وتحت الجمهرات السليفة التي يمكن الحصول عليها من دم الحبل السُّري البشري، ودراسة أثر تجميدها لفترات زمنيَّة طويلة، ثمَّ إزالة تجميدها واستنباتها ضمن شروط مماثلة لاستنبات الخلايا غير المجمَّدة. ومن خلال ذلك، ساهم البحث في الدِّراسات الحاليَّة على الخلايا الجذعيَّة البشريَّة المُولَّدة للدم بُغية حفظ عيَّات قابلة للاستعمال في الدِّراسات البحثيَّة الأساسيَّة على الخلايا المُولَّدة للدم طويلة الأمد والفعَّالة في عمليَّات الاغتراس. عُزلت الخلايا باستخدام عتيَّة خاصَّة بالانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا $CD34^+$ التي أُدخل عليها بعض التَّعديلات، وباستخدام عتيَّة خاصَّة أيضاً بالانتقاء المغناطيسي السلبي للخلايا $CD34^+$. وبعد تمييز الخلايا مناعياً بتمرير الخلايا في جهاز التَّدفق الخلوي رباعي اللُّون، وباستعمال مجموعة كبيرة من الأضداد وحيدة النسيلة للتعرف على مستضدات نسليَّة أو مُفعَّلة مختلفة، تبيَّن أنَّ لطريقة عزل الخلايا أثرٌ على مجموعة من المتغيِّرات التي لها دور في نتائج استنبات الخلايا وتكثيرها. واستنتج أنَّ الطَّريقة المُعدَّلة للانتقاء الإيجابي مكَّنت من الحصول على نسبة مهمَّة من السلائف الأوليَّة المُولَّدة للدم. والتي من جهة أخرى، تفوقت عليها طريقة الانتقاء السلبي بفروق معنوية إحصائيَّة، الأمر الذي فسَّر الاختلافات الواسعة بين الدِّراسات والأبحاث المتعلِّقة بالخلايا الجذعيَّة المُولَّدة للدم والتي كان مصدرها دم الحبل السُّري البشري. وانطلاقاً من نتائج طرائق عزل الخلايا تمَّ متابعة انقسامها وتكاثرها في الأوساط المغذيَّة استجابة لعوامل النُّمو التي دُعِّمت بها تلك الأوساط ودراسة تأثير كل من المصل البشري ومصل جنين البقر على الخلايا المستنبته، والتعرُّف على تمايزها بتبدُّل شكلها، وتزامن غياب/ظهور التَّعبير عن المستضدات السطحيَّة المميِّزة للخلايا الجذعيَّة /والمستضدات الدَّالة على التَّمايز بواسطة قياس الجريان الخلوي، إثر تحفيزها بواسطة مزيج من عوامل الإنقسام والتَّمايز، إضافةً إلى التحرِّي عن تمايزها الوظيفيِّ نحو وحيدات-بالعات كبيرة بدراسة قدرتها البلعمية لأحد الطفيليات داخل الخلية إلى جانب قياس النشاط التأكسدي في الجسيمات الحالَّة في الخلايا المتمايزة.

كلمات مفتاحيَّة: الخلايا الجذعيَّة المُولَّدة للدم، دم الحبل السُّري البشري، الوحيدات- البالعات الكبيرة، الانتقاء المناعي المغناطيسي، $CD34^+$.

المقدّمة

Introduction

1- المقدمة: Introduction

جسدت الخلايا الجذعية ثورة علمية وتطبيقية تعود باكورة البحث في مجالاتها إلى عام 1900، حين ظهرت فكرة تصميم عضو سليم يحل محل العضو التالف أو المريض لدى الكائن الحي، ومهد الطريق لاكتشاف ما سُمي بالخلايا الجذعية Stem Cells. وكان عدم نجاح أطباء نقي العظم Bone Marrow حينها في علاج مرضى اللوكيميا عن طريق غرس نقي العظم المنقول قد أوحى بضرورة إنشاء مخابر خاصة تهتم بعلاج أمراض نقي العظم (Jansen et al. 2002). وكانت أول عملية نقل خيفية Allogeneic Transfer (بين أفراد النوع نفسه) لنقي العظم في فرنسا عام 1950، وفي عام 1958 اكتشف الباحث جان دوسيه مستضد الخلايا البيض البشرية Human Leukocyte Antigen الذي سلط الضوء على حقيقة تواجد بروتينات على سطح خلايا الدم البيضاء أو مستضدات الهلا HLA (Sidney et al., 1996). وبيّنت أبحاث لاحقة دور هذه المستضدات السطحية في المنظومة المناعية للجسم عن طريق تحديد الخلايا السليمة والتي تخص الجسم نفسه (Thorsby, 2009). وفي جامعة تورنتو عام 1961 أثبت الباحثان إرنست ماكولك وجيمس تيل حقيقة وجود الخلايا الجذعية في نقي العظم وقدرتها على الانقسام الذاتي Self-Renewal وذلك في دراسة تناولت ازدياد Transplantation نقي عظم فئران سليمة بطريقة الحقن الوريدي الذيلي في فئران مضعفة مناعياً بالإشعاع، حيث شوهد في الفئران المشععة انتقال مجموعة خلوية نادرة غير متخصصة إلى الطحال. وقد انقسمت هذه الخلايا وشكلت نساقل Colonies خلوية ضمت مختلف أنماط خلايا الدم. كما أدى ازدياد النساقل الخلوية السابقة المتشكلة في طحال الفئران المشععة مناعياً Immuno Irradiated في فئران أخرى إلى نفس النتيجة وشكلت نساقل خلوية جديدة في طحالها. واستناداً إلى نتائج هذه التجربة وتجارب لاحقة أخرى للباحثين تم تعريف الخلايا الجذعية (Till and Mc, 1961) وتحديد صفاتها (Becker et al., 1963) على أنها خلايا غير متخصصة قادرة على الانقسام الذاتي يمكن توجيه تمايزها إلى النمط الخلوي المرغوب به (Siminovitch et al., 1963). كما أكد الباحثان أيضاً حقيقة وجود نمطين من الخلايا الجذعية عند الثدييات Mammals: الخلايا الجذعية الجنينية Embryonic Stem Cells (ESCs) المعزولة من الكتلة الخلوية الداخلية Inner Mass Cell للكيسة الأرومية Blastocyst، والخلايا الجذعية البالغة Adult Stem Cells والمتواجدة فقط ضمن النسيج البالغة Adult Tissues والمتخصصة، فالخلايا الجذعية تُؤدّي وظيفتين أساسيتين: الأولى انقسامها وتمايزها مُعطيةً الأنماط الخلوية المختلفة أثناء المراحل

المبكرة من التّامّي الجنيني Embryonic Development، والثانية تجديد الأنسجة الهرمة وتعويض التّألف منها خلال حياة الفرد (Jaishankar and Vrana, 2009). وحتّى عام 1969 هدفت الكثير من التّجارب المخبريّة لإنجاح عمليّات النّقل بين الأشقاء من أجل علاج العوز المناعي المشترك الشّديد (SCID) Sever Chronic Immunodeficiency (Kim et al., 2013). وتمّت في عام 1973 أوّل عمليّة زرع نقي غيريّة Heterogeneic Trasfer، واحتلّ عام 1984 ذروة أبحاث نقي العظم وخلال العقد الممتد ما بين 1980-1990 تمّ تغطية أكثر من 16 ألف عمليّة ازدياع Transplantation معظمها سُجّل لأغراض علاج سرطان الدّم Blood Cancers ومرض النّاعور Hemophilia ونقص المناعة المكتسبة (Lapidot, 2001) The Human Immuno Deficiency Virus HIV. ومنذ ذلك الحين حظيت الخلايا الجذعيّة باهتمام بحثي كبير كشف عن العديد من أنواع الخلايا الجذعيّة أغنى المعرفة ببيولوجيا الخليّة والآليّات الجزيئيّة المسؤولة عن الإنقسام والتّمايز الخلوي، وحقّق إمكانية حفظها وتجميدها واستخدامها لاحقاً عند الحاجة، الأمر الذي أتاح الاستفادّة منها تطبيقياً في المجالات الطّبيّة والعلاجيّة المختلفة (Antoniewicz-Papis et al., 2013).

الدراسة المرجعية

Literature Review

2- الدّراسة المرجعيّة: Literature Review

1-2. تصنيف الخلايا الجذعيّة:

تُصنّف الخلايا الجذعيّة إما وفقاً لقابليتها للتّمايز أو حسب المصدر الذي عُزلت منه؛ وتقسّم الخلايا الجذعيّة، حسب قدرتها على التمايز نحو نمط خلوي محدّد إلى خمس مجموعات (Alp Can,2008):

- خلايا جذعية كُليّة (شاملة) القدرات Totipotent Stem Cells: تتمايز باتجاه أي نمط خلوي والوحيدة القادرة على إعطاء كائن حي متكامل بالإضافة إلى خلايا المشيمة Placenta Cells، مصدرها البيضة الملقّحة Zygote والخلايا الناتجة عن الإنقسام الأول للبيضة الملقّحة (بدءاً من الخليتان البنّتان المتناظرتان Identical Cells).

- خلايا جذعيّة كثيرة القدرات Pluripotent Stem Cells: يمكنها أن تتمايز إلى أكثر من 200 نمط خلوي مصدرها الكتلة الخلوية الداخليّة للكيسة الأروميّة Blastocyst.

- خلايا جذعية متعدّدة القدرات Multipotent Stem Cells: تتمايز فقط إلى عدد محدود من الأنماط الخلوية مصدرها المشيمة Placenta، ودم الحبل السري Umbilical Cord Blood. وتوزع هذه الخلايا في ثلاث أنماط رئيسة تبعاً لأنماط الخلايا التي تتمايز عنها: الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic Stem Cells (HSCs)، والخلايا الجذعية المُتوسّطيّة (MSCs) Mesenchymal Stem Cells، ومماثلاتها في نقي العظم المسماة بالخلايا الجذعية السدويّة Stromal Stem Cells، والخلايا الجذعيّة العصبيّة Neural Stem Cells (NSCs).

- الخلايا الجذعيّة قليلة القدرات Oligopotent Stem Cells: التي تقتصر في تمايزها على خطّين خلويين أو أكثر مثل الخلايا الجذعيّة العصبيّة في الدّماغ.

- الخلايا الجذعية وحيدة القدرات Unipotent Stem Cells: تتمايز باتجاه خط خلوي وحيد مثل المنسليّات الأولى المكوّنة للنّطاف.

وفي عام 2005 أثبت الباحث ألبرت لاسكر أن البرنامج الجيني للخلية يمكن أن تُعاد برمّجته إلى البرنامج الجيني للخلايا الجذعيّة في البيضة الملقّحة، والتي تُعطي بعد ذلك الخلايا الجذعيّة الجنينيّة، وهذا ما أوحى بإمكانية تحويل الخلايا الجسميّة المتخصّصة إلى خلايا جذعيّة جنينيّة، عن طريق العوامل

الكيميائية والبيولوجية الموجودة في البيضة الملقحة. وتمكّن الباحثان Takahashi و Yamanaki عام 2006 في جامعة كويتو اليابانية من إعادة برمجة خلايا جلدية إلى خلايا غير متخصصة شبيهة بالخلايا الجنينية، درست في البداية عند الفئران عام 2006، ثم عند الإنسان لأول مرة عام 2007 باستخدام أربعة عوامل من تلك العوامل الموجودة في البيضة الملقحة Oct3/4, c-Myc, Sox2, Klf4 (Takahashi et al., 2007). أضافت هذه الدراسات ومثيلاتها مجموعة جديدة سميت الخلايا الجذعية كثيرة القدرات المحرّضة أو المحفّزة (iPSCs) Induced Pluripotent Stem Cells وهي خلايا متخصصة وناضجة Mature يمكن إعادة برمجتها Reprogramming وجعلها تعود عن تمايزها نحو خلايا ذات صفات وقدرات جنينية.

وتصنّف الخلايا الجذعية حسب مصدرها إلى أربع مجموعات رئيسية:

- خلايا جذعية جنينية Embryonic Stem Cells: تُعزل من الكتلة الخلوية الداخلية لأجنة في مرحلة الكيسة الأرومية نتجت عن عمليات الإخصاب في الزجاج In Vitro Fertilization، تكون مسؤولة عن تشكّل الجنين، وتطوره، ونموه. ولقد عُزلت الخلايا الجذعية الجنينية لأول مرة في الثمانينات من قبل مجموعات مستقلة من الباحثين (Evan and Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998).

- خلايا جذعية بالغة Adult Stem Cells: توجد على شكل تجمّعات متفرّدة في بعض الأنسجة البالغة، وتكون مسؤولة عن الحفاظ على الأنسجة من خلال تجديد خلاياها التي قد تتلف نتيجة عمليات التوسّف الطبيعية أو في الأذيات الناتجة عن الأمراض، فتعطي أنماطاً خلوية محددة تُميّز النسيج الذي توجد فيه، وهذا ما يميّزها عن الخلايا الجذعية الجنينية القادرة على التمايز إلى جميع أنماط خلايا الجسم. عُزلت الخلايا الجذعية البالغة في البداية من نقي العظم Bone Marrow (BM) ثمّ تمّ التعرف على المواضع الأخرى للخلايا الجذعية البالغة (الكبد، البنكرياس، الأمعاء، القلب، الأدمة، لب السن، القرنية، الدماغ، نخاع الشوكي) وكان لهذه الخلايا العديد من التطبيقات الهامة في مجال الهندسة النسيجية، كما استُعملت كنموذج للتعرف على الآليات الجزيئية المسببة للأمراض الوراثية ودراسة تأثير العقاقير والأدوية، وترميم الأذيات النسيجية العصبية والمعالجة الخلوية، ومن أهم التطبيقات للخلايا الجذعية البالغة علاج الأمراض الدموية الخبيثة والتي تعتمد على اغتراس نقي عظم سليم من قبل متبرّع بشرط توافق نسيجي بين المعطي والآخذ (Clemens V. et al, 2008)

- خلايا جذعية توجد في دم الحبل السري Umbilical Cord Blood: يشكل كل من المشيمة والحبل السري صلة الوصل بين الأم الحامل وجنينها طيلة فترة الحمل حيث يتم التبادل الغذائي. ودم الحبل السري هو الدم المحصور ضمن أوعية المشيمة والحبل السري، الذي يُبتر بعد الولادة مباشرة. تُجمع عينات دم الحبل السري خلال العشرين دقيقة الأولى من لحظة الولادة، وتُحفظ في شروط تجميد ملائمة لأغراض سريرية وأخرى بحثية بفضل احتوائه على أنماط مختلفة من الخلايا الجذعية متعددة القدرات، وهي الخلايا الجذعية المولدة للدم (HSCs)، والخلايا الجذعية المتوسطة (MSCs)، والخلايا البطانية الوعائية (Vascular Endothelial Stem Cells (ETHSCs)). كما وُجد في دم الحبل السري العديد من النماذج الخلوية الأخرى التي لم تُوصف بدقة حتى الآن. (Tomas K. et al, 2006).

_خلايا جذعية توجد في السائل الأمنيوسي Amniotic Fluid Stem Cells: السائل الأمنيوسي أو السلي هو الوسط المائي الذي يحيط بالجنين ويسبح ضمنه بمرونة خلال فترة الحمل، له دور في حماية الجنين من الصدمات الخارجية ويُسهل خروجه أثناء الولادة.

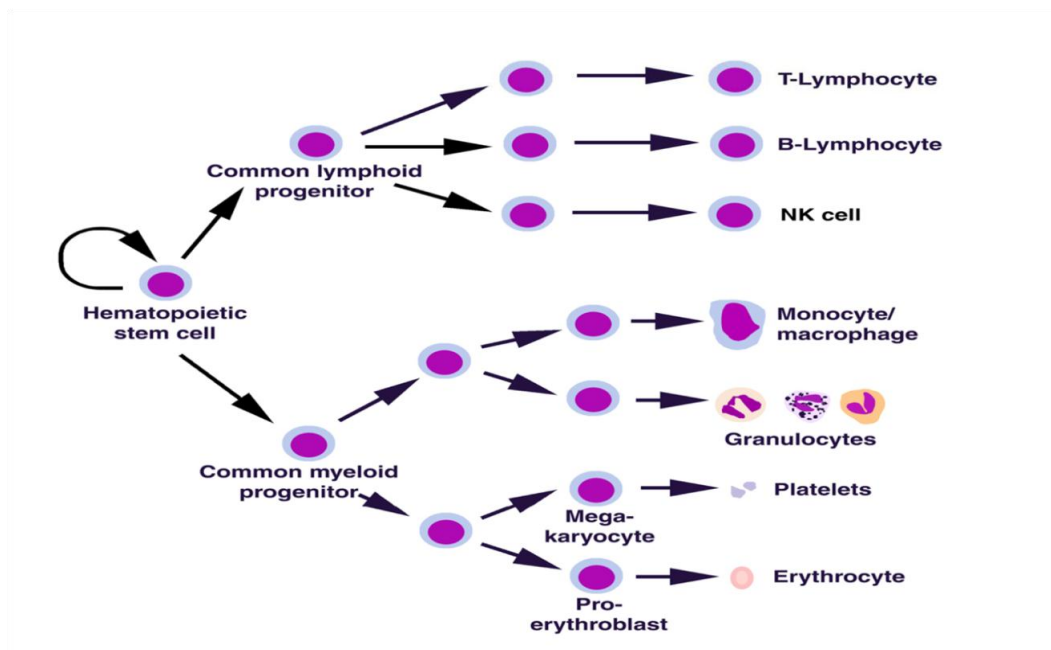
كشفت دراسة للباحث Atala وزملائه في جامعة هارفرد 2007 احتواء هذا السائل على خلايا جذعية متعددة القدرات شبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية مصدرها أنسجة الجنين (Atala 2012, Abdulrazzak et al., 2013)، وأثبتت دراسات لاحقة له أنه يمكن توجيه تمايز هذه الخلايا باتجاه أنماط خلوية متنوعة، كما أنها لم تشكل أوراماً مسخية Teratoma خلال الاستنابات في الزجاج أوفي الكائن الحي، ولم تواجه أي من الصعوبات أوالمشاكل الأخلاقية في المجالات البحثية والعلاجية، لذلك احتلت مكانة مرغوبة وأكثر تفضيلاً لدى الباحثين بالمقارنة مع الخلايا الجذعية الجنينية كأداة واحدة يمكن حفظها وتجميدها في شروط مناسبة لغرض تشخيص وعلاج العديد من الأمراض. (Wang et al., 2013, Rodrigues et al., 2012).

2-2. الخلايا الجذعية المولدة للدم Hematopoietic Stem Cells:

2-2-1. تكوّن الخلايا الدموية Hematopoiesis ومنشأ الخلايا الجذعية المولدة لها:

إنّ تكوّن الدم Hematopoiesis عملية يتم من خلالها التعويض المستمر لخلايا الدم، من 8 سلاسل series أو أنسال lineages خلوية على الأقل، بدءاً من مجموعة خلوية واحدة هي مجموعة الخلايا الجذعية المُكوّنة لخلايا الدم كثيرة القدرات Pluripotent Hematopoietic Stem Cell وذلك طيلة

حياة الإنسان الشكل (1-2). وهذه الخلايا الجذعية نادرة، إذ تتواجد بنسبة 0.001% من مجموع خلايا نقي العظم المنوأة. وهي خلايا هاجعة Quiescent في الحالة الطبيعية، تبقى في الطور G_0 أو G_1 من الدارة الخلوية (Clapp et al., 1989).



الشكل (1-2): مخطط تكوّن خلايا الدّم بدءاً من الخلية الجذعية المؤدّة للدّم.

أشارت دراسات علم الجنين إلى أنّ تكوّن الخلايا الدّموية يبدأ في الكيس المحيّ *yolk sac* بعد 7 أيام تقريباً من بدء التكوّن الجنيني، ثم يصبح الكبد بعد اليوم العاشر الموقع الرئيسي لتكون تلك الخلايا، وبعد 6 أشهر يصبح نقي العظم هو الموقع الرئيسي لتكون خلايا الدّم ويستمر كذلك طيلة حياة الفرد (Clapp et al., 1989). لكن الدراسات الأحدث التي أجريت على أجنة الثدييات وبخاصة الفئران أشارت إلى أنّ الخلايا الجذعية المكوّنة لخلايا الدّم $CD34+$ تتكوّن بالقرب من الجدار البطني للأبهر بعد 5 أسابيع من الحمل وقد اقترحت تلك الدراسات أنّ هذه الخلايا الجذعية تنشأ في منطقة الغدد التناسلية للشريان الأورطي *Aorta-Gonad-Mesonephros region (AGM)* وهي الخلايا الأصل للكبد والنقي وتحافظ على توليد خلايا الدّم طيلة حياة الفرد (Sugiyama and Sasaki, 2013).

وعند إزراع هذه الخلايا في حيوانات بالغة كانت قادرة على توليد خلايا الدم من سلالات مختلفة (Tavian and Peault, 2005).

من ناحية أخرى فإن عملية تكوّن خلايا الدّم تتضمّن تقييد مُتصاعد للتّنامي Development، مع زيادة في القدرة على التّكاثر، وتراجع في القدرة على التّجدد الذاتي Self-Renewal Capacity للخلايا السلائف Progenitors. بحيث أنّه، وبعد التخصّص، تصبح هذه الخلايا أقلّ قدرة أو غير قادرة على التكاثر كما ويقصر عمرها أيضاً (Konuma et al., 2011).

وعملية النّضوج والتّمايز هذه مضبوطة بإحكام، وأي خلل فيها يؤدي إلى حدوث ابيضاض دُموي Leukemia، أو فقر دم Anemia، أو عوز مناعي Immunodeficiency، أو غياب لأنماط خلويّة مُعيّنة (عوز خلوي) وما يترتّب على ذلك من شذوذات (Peault and Tavian, 2003).

ويبدأ تكوّن خلايا الدّم عندما ينشأ عن الخلايا الجذعيّة كثيرة القدرات $CD34^-CD45^-$ خلايا جذعيّة مُتعددة القدرات $CD34^+CD45^+$ سليفة للخلايا النّقيويّة Myeloid Progenitors وخلايا جذعيّة مُتعددة القدرات سليفة للخلايا اللمفاويّة Lymphoid Progenitors. والتي يمكن كشف مستعمراتها في طحال الفئران المُشعّعة بجرعات مميتة بعد ثمانية أيام من حقنها باستعمال مقايّسة تكوّن المستعمرات الخلويّة في طحال الفئران Spleen Colony Assay. ولذلك سُمّيت هذه الخلايا بالوحدات المكوّنة للمستعمرات الخلويّة Colony Forming Units (CFUs)، والتي تتميز بقدرة محدودة على التّجدد الذاتي، وبقدرتها على تكوين خلايا الدّم من أنماط مختلفة عند زراعتها في أوساط سائلة أو على أوساط نصف صلبة تحتوي عوامل نمو الخلايا الدّموية مثل: IL-3، GM-CSF، M-CSF، G-CSF، IL4، EPO، SCF، IL-6، IL-11، C-Kit-ligand وغيرها، والتي توجّه تمايز الخلايا المكوّنة للمستعمرات إلى خلايا دمويّة ناضجة متخصّصة (Zhang et al., 2010).

ويجدر بالذكر أنّ عملية تكوّن خلايا الدّم هي عملية مصّونة تضبطها آليات جزيئيّة معقّدة كانت ولا زالت موضوع أبحاث مستمرة، وقد تمّ تحديد عدد من الجينات الأساسيّة المسؤولة عن تكوّن الخلايا الجذعيّة المكوّنة لخلايا الدّم وعمل تلك الخلايا في الفرد البالغ (Colpitts et al., 2013).

كما دُرُس تأثير عوامل نمو الخلايا الدّموية Hematopoietic growth factors والتي ترتبط إلى مستقبلات نوعيّة على سطوح الخلايا لتولد شلالات معقّدة ومتشابكة من أحداثات نقل الإشارة Signaling Events داخل الخليّة، ينتج عنها حدوث تغيّرات في التّعبير الجيني Gene Expression الذي يوجّه الخليّة نحو التّكاثر أو التّمايز (Saran et al., 2013).

والخلايا المكوّنة للدمّ تستجيب لإشارات عوامل النّمو من خلال تنشيط مستقبلاتها التي تملك فعالية تيروزين كيناز أو مرتبطة داخل الخلية ببروتينات لها نشاط تيروزين كيناز، مثل C-kit، والتي تؤدي الطفرات فيه إلى حدوث فقر دم الخلية Macrocytic Anemia وإلى خلل في تكوّن المستعمرات الطّحالية، وفشل في تكوّن الخلايا الدّمويّة على المدى الطّويل. كما أنّ الطّفرات في ربيطة هذا المستقبل تؤدي إلى تكوّن بيئة حاضنة أو كَنَف (عش) Niche لا يدعم نمو الخلايا الجذعيّة (Saran et al., 2013).

ومن أهمّ المستقبلات التي على علاقة بتكوّن الدمّ مستقبلات السيبتوكينات Cytokines Receptors والتي تنقل الإشارة من خلال المسار Jak/Stat والمسار Mak1/Erk، فسيتوكينات تكون الدم لها دور أساسي في صيانة الحالة الثابتة Steady-State والمُستقرّة لتكوّن الدمّ بشكلٍ سليم. فمثلاً مستقبل الإيثروروبوتين (Epo) له دور في تكاثر وبقاء الخلايا المولّدة لخلايا الدمّ الحمراء، وفي توجيه تمايز نسلها إلى خلايا دم حمراء، وتؤدي الطّفرات الطّائرة على هذا المستقبل إلى موت الفئران في اليوم 13، أو إلى خلل في تكوّن الخلايا الدّموية في كبد الجنين (Todaro et al., 2013).

ومن ناحية أخرى، أظهر التحليل الوراثي وجود دور رئيسي لعدد من عوامل الانتساخ Transcription Factors في تكوّن طلائع الخلايا الدّموية. وهذه العوامل منها ما له تأثير عام في تنظيم التعبير عن جينات معينة نوعيّة لتمايز الخلايا الدّموية ونُضجها ومنها ما هو نوعي بالتّمايز إلى أنماط خلويّة محدّدة. بدليل أنّ الطّفرات التي تطرأ عليها منها ما يؤثر على تمايز ونضج كل نسل الخلايا الدّموية فمنها ما يخص نسيلة بعينها فمثلاً الطفرات في العامل GATA يُوقف تمايز ونضج كل الخلايا الدّمويّة، في حين أنّ الطّفرات في العوامل Pu.1، Rbtn2 يُوقف نُضج خلايا الدم الحمراء فقط (Orkin, 1995).

2-2-2. ازدياد الخلايا الجذعيّة المولّدة للدمّ Hematopoietic stem cell transplantation:

جرّت العادة أن المصدر التّقليدي للخلايا الجذعيّة المولّدة للدمّ Hematopoietic Stem Cells هو نقي العظم Bone Marrow. وكان يتم ازدياده بهدف تمكين الأطباء من زيادة شدة جرعات المُعالجّة الكيميائيّة والمُعالجّة الإشعاعيّة والتوصّل إلى حدّ القضاء على الخلايا السرطانيّة داخليّة المنشأ. واستخدم بالتالي في علاج أمراض اللّمفومات والابيضاضات وسرطان نقي العظم المتعدّد وكذلك سرطان النّدى،

حيث تتم العملية إما بطريقة البزل القطني أو بتحريض انتقال الخلايا الجذعية المكونة للدم من نقي العظم إلى الدم المحيطي Peripheral Blood والتي تُجمع لاحقاً من أجل ازدياعها (Dasgupta et al., 1996). واعتمدت غرسات نقي العظم ولفترة طويلة في كل من الهندسة الجينية والمعالجة الخلوية (Vose, 2013)، واحتلت الخلايا المحضرة بهذه الطريقة دوراً مهماً وعلى وجه الخصوص لعلاج اعتلالات وشذوذات أمراض الدم (التلاسيميا، قلة الصفائح، نقص التصاق الخلايا البيض، فقر الدم المنجلي، سرطان الدم، شذوذ نقي العظم الالبيضاوي، العوز المناعي وسواها) (Daley, 2012).

ومن مميزات المعالجة بازدياع الخلايا الجذعية المولدة للدم والمعزولة من نقي العظم أن لا حاجة لفهم تفاصيل العملية كشرط لتطبيق المعالجة فعدد ومصير الخلايا المزدعة يكون منظماً، والخطورة السميّة للعلاج تقتصر على الطور الحاد خلال تحضير العائل المضيف لتقبل الطعم، وتطبيق المعالجة لمرة واحدة فقط. وعلى العكس من ذلك، فللعلاج الطبي الكيميائي (الذي يعتمد استعمال مواد كيميائية تؤثر على أهداف جزيئية داخلية) تأثيرات سميّة خلوية عادةً أينما تمّ التعبير عن تلك الجزيئات المستهدفة، وأن هذه المعالجات الكيميائية بطبيعتها مُزمنة ومُلازمة طالما بقي المرض موجوداً (Weissman, 2000).

لكن رغم ذلك، هناك صعوبات واجهت عمليات ازدياع نقي العظم اقتضت عملاً مخبرياً هاماً يتم قبل عملية الزرع لكل من العائل المضيف والمتبرع Donor. فبعد الحصول على موافقة المتبرع وإطلاعه على مخاطر العملية وماهيّتها يتم تحضيره مخبرياً بما يشمل تاريخه الطبي، صور شعاعية للصدر، تخطيط كهربية القلب، تعداد خلايا الدم واختبار عوامل التخثر، اختبار الواسمات المرضية المعدية، وهناك حاجة إلى تخدير عام وإقامة في المشفى. وقد تُسبب عملية العزل أحياناً أعراضاً مرضية أو أذية للمتبرع أو المريض بنسبة تتراوح ما بين (6%-20%)، تشمل ألماً في موضع الجمع، إعياء، ألماً أثناء المشي أو الجلوس وأمور نادرة بنسبة (0.1%-0.3%) قد تهدد حياة المتبرع الاجتماعية والعملية مثل أذية ميكانيكية للعظم أو فتق حرقفي عجزّي أو ألم النسا الوركي. بالإضافة إلى أن سحب هذه الخلايا قد يترافق بإنتانات ونزوفات دموية، كما يشكّل كل من الرّفص المناعي الناتج عن عدم التوافق النسيجي الذي يتطلب ديمومة المعالجة بالأدوية المثبطة للمناعة، وأحياناً التلوث الفيروسي أحد الأسباب الرئيسية للبحث عن بديل لخلايا نقي العظم.

وفي العقد الأخير صار الدّم المحيطيّ مصدراً أكثر رواجاً من نقي العظم كبديل أثبت أنّه أقلّ إِمراضيةً وتسبباً في الوفيات، كما أنّ تعويض الخلايا التّالفة في الدّم أسرع. لكن بالمقابل أثبتت دراسات أن هناك زيادة في حالات الإصابة بداء الطّعم حيال الثّوي (GVHD) المرتبط بزيادة تعداد اللّمفاويّات التّائية والخلايا القاتلة الطّبيعية عند المريض المتلقّي والتي مصدرها المتبرع (Bojanic et al., 2009). وقد دفع هذا الأمر الباحثين منذ عام 1970 إلى التّوجّه نحو دراسة الخلايا الجذعيّة المولّدة للدّم المعزولة من دم الحبل السّري (Koestenbauer et al., 2009)، التي تندرج تحت الخلايا الجذعيّة البالغة متعدّدة القدرات كونها تملك خصائص وظيفيّة أكثر تقييداً بالمقارنة مع الخلايا الجذعيّة الجنينيّة، إلى جانب مقدرتها على الانقسام الدّاتي والمستمر.

2-2-3. صفات الخلايا الجذعيّة المولّدة للدّم في دم الحبل السّري:

يُعتقَد بأن وجود الخلايا الجذعيّة في دم الحبل السّري متعلّق بعوامل النّمو التي تحررها خلايا المشيمة أو بسبب توتّر الأوكسجين المنخفض عند الولادة low oxygen tension، بدليل أنّ أعداد هذه الخلايا الجذعيّة في دم الوليد تتخفّف كثيراً بعد ساعات من الولادة لتصبح ضمن مجال الأعداد الطّبيعية الملاحظة لدى البالغين (Roy et al., 2012). بالإضافة إلى أنّ العدد المُطلق والنّسبة المئويّة للخلايا الجذعيّة المُكوّنة للدّم CD34 من مجموع الخلايا وحيدة النّواة MNCs يتناسبان عكساً مع عمر الحمل (Jin et al., 2000).

وتعود محاولات استعمال دم الحبل السّري (Umbilical Cord Blood (UCB) على وجه الخصوص كمصدر للخلايا الجذعيّة المُكوّنة لخلايا الدّم إلى أواخر السّتينات ومطلع السبعينات من القرن العشرين. وقد نُشرَ أوّل تقرير للأخوين Ende إندي عن محاولة لنقل دم الحبل السّري إلى مريض ابيضاض دم معالج كيميائيّاً عام 1972 (Ende and Ende, 1972). لاحقاً بينت دراستان منفصلتان لكلّ من Koike و Vidal (Koike K,1983 and Vidal JB,1985) أنّ دم الحبل السّري يحتوي على الخلايا المولّدة لخلايا الدّم بأعداد تكفي لإجراء عمليّات إزدراع النّقي، وأنّ حفظ هذه الخلايا تحت شروط التّجميد لايؤثّر على عيوشيتها (حيويتها) Viability، ولا على قدرتها على التكاثر.

كما أجرى Broxmeyer وزملاؤه ، سلسلة من الدّراسات التي بحثت في محتوى دم الحبل السّري من الخلايا المولّدة لخلايا الدّم وصفات تلك الخلايا، كما طوّروا طرائق عمليّة ناجحة لجمع وتخزين دم الحبل السّري للإستعمالات الطّبيّة. وقادت تلك الجهود إلى إجراء أول عمليّة ناجحة لإزدراع خلايا دم الحبل

السُّري لدى طفل كان يعاني من فقر دم فانكوني Fanconi Anemia في السَّادس من تشرين الأوَّل عام 1988. وأكَّد النَّجاح طويل الأمد للغرسة (الطعم)، وتمايز الخلايا المزرعة إلى أنسال خلوية نقوية ولمفاوية وُجود الخلايا الجذعيَّة كثيرة القدرات Pluripotent Stem Cell في دم الحبل السُّري (Broxmeyer et al., 1992a).

كما قام Broxmeyer وزملاؤه، بتقييم استعمال خلايا دم الحبل السُّري في معالجة البالغين، ومع أن أعداد الخلايا المنوَّاة أقل بكثير من تلك التي تحتويها غرائس النَّقي فإن هذه الخلايا المولَّدة في دم الحبل السُّري كانت لها قدرة أكبر وأعلى على التَّضاعف والتَّوسُّع النسيلي في الزَّرعات السَّائلة قصيرة الأجل (Broxmeyer et al., 1992b)، وقد أكَّد ذلك ما توصَّل إليه Cardoso بأنَّ الخلايا $CD34^+CD38^-$ تضاعفت بما يزيد عن 6-7 أضعاف عن الخلايا المعزولة من النَّقي (Cardoso et al., 1993).

وأشارت العديد من الدَّراسات أنَّ الأمر قد يعود إلى أنَّ التيلوميرات Telomeres في الخلايا الجذعيَّة المولَّدة للدم (HSCs) المعزولة من دم الحبل السري (UCB) أطول بالمقارنة مع تلوميرات الخلايا في نقي العظم (BM) وبذلك أصبحت قادرة على البقاء لمدة أطول في وسط الاستنبات (Zimmermann et al., 2004, Schuller et al., 2007).

وبناء على نجاح حالات لغرائس دم الحبل السري تم تأسيس السَّجل الدَّولي لغرسات الحبل السُّري International Cord Blood Transplant Registry (ICBTR) عام 1992، وتأسيس أول بنك لتخزين وحفظ وحدات دم الحبل السُّري في بنك الدَّم في نيويورك عام 1993، وتأسيس السَّجل الأوروبي لغرسات الحبل السُّري Euro-Cord Transplant Registry (ECTR) وبحلول العام 2003 كان قد تمَّ تخزين أكثر من 100,000 وحدة دم حبل سري مُنمَّطة نسيجياً وجاهزة لعمليات الإزديراع وقد استفاد منها 3500 مريضاً معظمهم من الأطفال (Eapen et al., 2010). وقد شجَّع ذلك بقيَّة الدُّول والمؤسَّسات الخاصَّة على تأسيس بنوك لوحدات دم الحبل السُّري بما في ذلك البلدان العربيَّة.

والخلايا الجذعية الموجودة في دم الحبل السُّري تُشبه تلك الموجودة في نقي العظم من حيث القدرة على التَّجُدُّ الذاتي والتَّمايز إلى أنسال خلويَّة مختلفة، ولكن تشير الدراسات إلى أن هذه الخلايا هي خلايا بدئيَّة Primitive رغم أنَّها تُعبَّر عن المستضدَّات CD34 وCD33 وعن HLA-Dr وهي بذلك تختلف عن الخلايا الجذعيَّة الموجودة في النَّقي التي تُعبَّر عن هذه المستضدات في حال كانت متمايزة (Traycoff et al., 1994).

فقد بين الباحثان Hao (Hao et al., 1995) و Cardoso (Cardoso et al., 1993) أنّ التعبير عن المستضد CD38 يُميّز تحت جمهرات مختلفة من هذه الخلايا الجذعية، فبينما تُمثّل الخلايا $CD34^+CD38^-$ جمهرة هاجعة، فإن الخلايا $CD34^+CD38^+$ تُمثّل خلايا جذعية لها قدرة طويلة الأمد على التكاثر Clonogenic في الوسط الصناعي لأكثر من 8 أسابيع، وأنّ هذه القدرة تُسرّع من استجابة هذه الخلايا بالتّحريض بالسيتوكينات في الوسط الصناعي. وتولّد كل خلية $CD34^+$ أعداداً كبيرة من الخلايا بالمقارنة مع نظيراتها في نقي العظم.

وعندما قارن الباحث Lansdrop بين تضاعف الخلايا الجذعية المعزولة من الحبل السري مع تلك المعزولة من نقي العظم، أو المعزولة من كبد الجنين وذلك في وسط مجرد من المصل ومزود بخليط من السايبتوكينات وتحديداً: IL-3، IL-6، SCF، EPO، تبين له بأنّ أعداد الخلايا $CD34^+$ المعزولة من نقي العظم بقي ثابتاً، في حين ازدادت أعداد الخلايا $CD34^+$ المعزولة من دم الحبل السري مئات المرّات وازدادت أعداد الخلايا $CD34^+$ المعزولة من كبد الجنين آلاف المرات (Lansdrop et al., 1993).

كما بيّن Carow أنّ الخلايا المولّدة للدم الموجودة في دم الحبل السري لها قدرة أكبر على التكاثر في أطباق الاستنبات بالمقارنة مع الخلايا المولّدة للدم المعزولة من نقي العظم. وعند إضافة بلازما دم الحبل السري إلى وسط الاستنبات تتعرّز هذه القدرة على التكاثر بشكل كبير مما أشار إلى وجود عوامل نمو أخرى في بلازما الحبل السري غير موجودة في دم الأشخاص البالغين (Carow et al., 1993).

وأثبت Lewis أنّ لدم الحبل السري أفضليّة على النقي من حيث احتوائه على أعداد أكبر من الخلايا المولدة التّوقية والمفاوية عند اليوم 0 وبعد 5 أسابيع من الاستنبات (Lewis and Verfaillie, 2000).

ومن ناحية الدّراسات في الجسم الحي In vivo تمّ تقدير هذا العدد بخلية جذعية واحدة من النمط $CD34^+CD38^-$ من بين 44 خلية وذلك باستعمال تقنية الحقن المباشر في نقي عظم الفئران ناقصة المناعة بدلاً من الحقن عبر الوريد الذيلي (Yahata et al., 2003).

وأثبتت دراسة، أنّ دم الحبل السري يحتوي خلايا بدئية $CD34^-$ قادرة على تكوين خلايا الدم في الفئران ناقصة المناعة بالإضافة إلى قدرتها الأكبر على التكاثر، خاصّة وأنّ نسبة الخلايا المولّدة الموجودة في حالة انقسام في دم الحبل السري تصل إلى 50% (Wang et al., 2003).

وبالإضافة إلى تواجدها بأعداد أكبر بالمقارنة مع التقي فإن من الصفات الأخرى المميّزة للخلايا الجذعية الموجودة في دم الحبل السري أنها غير ناضجة مناعياً وأكثر تسامحاً تجاه عدم التّطابق في الزمر HLA بين المتبرّع والآخذ، وبالتالي فإنّ خطورة حدوث مرض الرّفص المناعي للغرسة أو الطعم GVHD يكون أقلّ حدةً في حال حدوثه. ويؤكد ذلك نجاح عمليات إزدراع دم الحبل السري وبخاصة لدى الأطفال. (Laughlin et al., 2001، Schmitz and Barrett, 2002).

كما أكّدت العديد من المجموعات البحثية أنّ الخلايا الجذعية المولّدة للدم تتّصف بالمرونة Plasticity واستطاع الباحثون جعل الخلايا الجذعية تتجاوز الخطوط السلالية الخاصة بها. فمثلاً، حوّلت الخلايا الجذعية المولّدة للدم إلى خلايا كبدية وعظمية وعصبية ووعائية وعظمية وذلك حسب طبيعة وعدد العوامل المضافة إلى وسط الاستنبات (Parker et al., 2004, Hurlbut and Doerflinger, 2004).

وعزّي ذلك أيضاً إلى أنّ خلايا دم الحبل السري تحتوي بالإضافة إلى السلائف المولّدة للدم Hematopoietic Progenitors سلائف أخرى غير مولّدة للدم Mesenchymal Progenitors؛ مثل السلائف المتوسطة Endothelial Cell Progenitors والطلائع العصبية Neuronal Precursors (Ghen et al., 2006). وتمّ توثيق ذلك عندما تبين أنّ الخلايا المعزولة من دم الحبل السري البشري تُعبّر عن كل من الجينات Oct3/4 و Sox2 و Mdr1 و Rex1، والتي تُعدّ الجينات المرمّزة للعوامل المنظّمة التي تسيطر في حالة الخلية الجذعية كثيرة القدرات (Habich et al., 2006). لهذا يُشكّل حالياً دم الحبل السري المصدر البديل الأكثر قبولاً للخلايا الجذعية المتوسطة والخلايا الجذعية المولّدة للدم (William T, 2005).

وتزايد في السنوات الأخيرة، وبشكل كبير، استعمال الخلايا الجذعية المولّدة للدم المعزولة من دم الحبل السري في معالجة العديد من الأمراض، حيث يُعدّ المصدر الأكثر أماناً وسهولةً في الاعتيان. وباستعماله، تمّ تجنّب التّطرق إلى الصّعوبات التّقنية والإشكاليّات الأخلاقية التي تعاني منها الخلايا الجذعية المأخوذة من المصادر الأخرى (Cutler and Ballen, 2009). وغداً دم الحبل السري المصدر البديل الأنسب لأغراض تعديل الاستجابة المناعية وعلاج أمراض الجهاز المناعي، كأعراض المناعة الذاتية ذات الأساس الوراثي وخاصة تلك المتعلقة باستجابة الخلايا التائية مثل مرض السكّري من النمط 1

والتصلُّب المتعدّد، كذلك استهداف أمراض الدّم الخبيثة، وتعويض خلايا الدّم بأنماطها حسب الشذوذات التي يعاني منها الشّخص المصاب (Younan et al., 2013).

2-2-4. تنميط الخلايا الجذعية المولدة للدّم:

ساهمت الدراسات على المستوى الجزيئي Molecular Biology في تغطية مفاهيم بيولوجيا الخلية وفهم أكثر عمقاً لمتغيرات الخلية الخارجية والداخلية. فالخلايا الجذعية المولدة للدّم تُعبر عن مستضدات أو واسمات سطحية فريدة تجعلها قابلة للتمييز عن بقية الأنماط الخلوية، تنتمي إلى مُعقدات عناقيد التمايز Cluster of Differentiation (CD) التي لها دور في تفسير فيزيولوجيا الخلية، وهذه المستقبلات هي بروتينات سطحية Surface Receptors أو رباط Ligands (Lanza et al., 1994)، يضبط غياب التعبير عنها أو وجودها سير سلوك الخلية ويحدّد وظيفتها بتفعيل أو تثبيط سبل إشارية Signaling Pathways نوعية، وقد تلعب دور جزيئات التصاقية Adhesion Molecules. ولدى الباحث Hayflick هناك أكثر من 167 مُتغيراً Parameter يمكن تتبعه مع هَرَم Aging الخلوية وتبدل المُستقبلات الغشائية السطحية (Hayflick, 1980).

2-2-4-1. الواسمات الغشائية Surface Receptor المميزة للخلايا الجذعية:

قدّمت تقنية القياس الخلوي بالتدفق أو ما يدعى قياس الجريان الخلوي طريقة سريعة دقيقة وموثوقة للكشف الكيفي والكمّي عن المستضدات الخلوية الغشائية التي تُعبر عنها جمهرة خلوية صغيرة (الخلايا الجذعية المولدة للدّم المعزولة من دم الحبل السري) باستعمال أصداد موسومة بأصبغة متفلورة، بالإضافة إلى تقييم عدد الخلايا الحية في المُعلق الخلوي، والاستفادة من خاصية طرح الأصبغة المتفلورة من قبل الخلايا الجذعية في تقسيم الخلايا الجذعية إلى تحت جمهرات.

وأشارت الدراسات بأنّ الخلايا الجذعية المولدة للدّم تتّصف بالتعبير المُرتفع Bright عن الواسمة CD34 بصورة نوعية خلال المراحل المبكرة من تطورها في نُقي العظم أو في دم الحبل السري البشري، وهي تتضمّن تحت جمهرات من الخلايا ذات خصائص سليفة. ويترافق التعبير عن الواسمة CD34 بالتعبير المُتوسّط عن الواسمة CD45 والواسمة CD133، وعن مُستضد الكريات البيض Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR)، بينما يكون التعبير عن الواسمة CD90 متبدلاً، ومنخفضاً إلى متوسطاً للواسمة CD13، ومرتفعاً إلى متوسط للواسمة CD117، و CD123 و CD135، ومنخفضاً جداً للواسمة CD33، ومنخفضاً أو غائباً للواسمة CD38. ولا تُعبر الخلايا الجذعية المولدة

للدّم والخلايا السليفة في هذه المرحلة عن المستضدات التي تُمَيِّز خطأً خلويّاً مُحدّداً أو عن مستضدات المراحل المبكرة من التمايز. ومع النضج الأوّلي لهذه الخلايا، تبدأ بالانقسام والتكاثر وتكتسب التّعبير عن الواسمة CD38 و CD117، ويتراجع ويشكل طفيف التّعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD133، وينخفض التّعبير عن الواسمة CD90. ويؤدّي النضج المتقدّم لهذه الخلايا، والتي تبدو على شكل جماعة خلوية متجانسة، إلى تمايزها إلى مكونات مختلفة مثل وحيدات النوى التّفويّة Myelomonocytic، وخلايا تُولّد الكريات الحمر Erythroid، والخلايا اللمفيّة Lymphoid، وأنماط خلويّة أخرى. ويترافق ذلك مع اكتساب المستضدات المرتبطة بالخط الخلوي ونمط التّعبير عنها الذي يُمَيِّز هذا الخط الخلوي عن جميع الخطوط الخلوية الأساسيّة؛ حيث تُفقد (تغيب) كل من الواسمات CD34 و CD133 و CD117. وفي ما يتعلّق باللمفاويّات البائيّة، تُبدي هذه الخلايا فقداناً للواسمة CD33 و CD13 وتراجعاً في التّعبير عن الواسمة CD45، وبالمقابل تُكتسب الواسمتين CD10 و CD19 مع المحافظة على الواسمة HLA-DR. بينما يتصف التمايز باتجاه الخط الخلوي للكريات الحمر باكتساب ساطع (مرتفع) للواسمة CD71، ومتوسطاً للواسمة CD36، وتراجعاً في الواسمة CD45 و HLA-DR و CD13 و CD33 وزيادةً أوّليّة معتدلة في التّعبير (Darzynkiewicz, et al., 2004).

حديثاً، اهتمت العديد من الدّراسات بمقارنة النمط المناعي للخلايا الجذعيّة المؤلّدة للدّم بحسب مصدرها وأثبتت أن هناك فروقات في طبيعة التّعبير عن بعض الواسمات (المستضدات أو المستقبلات) السّطحية ونسب تحت الجمهرات السّليفة، وبالتالي تُفسّر الفروقات المتعلّقة بقدرة الخلايا على التّضاعف والتّمايز، واستمراريتها في وسط الاستنبات وغير ذلك، الأمر الذي انعكس بدوره على التّطبيقات السريريّة للعلاج الخلوي والجيني باستعمال الخلايا الجذعيّة المؤلّدة للدّم (Ngoma et al., 2011, Liu et al., 2011, De Smedt et al., 2011).

2-2-4-2. عزل الخلايا الجذعيّة المؤلّدة للدّم:

لدراسة نمط خلوي، لا بد من عزله عن بقية الأنماط الخلوية الأخرى التي يتواجد معها. لذلك ابتدع الباحثون عدّة طرائق لإغناء Enrichment، وفرز Sorting، وفصل Separation، وعزل Isolation، أنماط عديدة من الخلايا لإكثارها في الأوساط الصّناعية وتطبيق معالجات مختلفة عليها، أو تحويلها جينياً وإعادة زراعتها في الجسم الحي لأغراض المعالجة الجينية Gene therapy للأمراض الوراثيّة. ويضاف إلى ذلك ترميم الوظائف المعطلّة في النّسج المريضة، والتّشخيص ما قبل الولادة والمعالجة الخلوية

Cell-based Therapy، وهندسة النّسج Tissue engineering لترميم النّسج النّالفة وفصل الخلايا الورميّة عن الخلايا الطّبيعية في حالات ازدياع النّقي الدّاتي وفصل اللّمفاويّات لمنع حدوث رفض الطّعم في حالات ازدياع النّقي غير الدّاتي. ويستند ذلك على طرائق إمّا تعتمد على الصّفات الفيزيائيّة للخلايا وتُعد طرائق تقليديّة تتضمّن التثقيل Centrifugation كما في تحويل العينات الدّموية إلى غلالة بيضاء، أو فصل وحيدات النّوى على وسط الفيكول أوالبيركول، وطرائق تعتمد الصّفات الكيميائيّة والفيزيائيّة الحيوية للخلايا مثل الإغناء باستعمال عتيده الإنتقاء الايجابي أو السّليبي التي تعتمد مبدأ الألفة Affinity للأضداد النوعية ومبدأ الاستتفاذ Depletion والفصل المغناطيسي Magnetic separation (Law et al., 1993). وعلى هذا الأساس، أولت العديد من الدّراسات الحديثة اهتماماً كبيراً بطريقة التعامل خارج الكائن الحي EX-Vivo مع الخلايا الجذعية المولّدة للدم CD34⁺ وتحت الجمهرات السّليفة أثناء عزلها لتستعمل لاحقاً في العديد من المجالات السريريّة كاغتراس الخلايا المولّدة للدم وفي المعالجة الجينيّة. كما تم الإشارة إلى تآثر هذه الخلايا بطريقة العزل المُطبّقة، الأمر الذي ينعكس على تواتر ترميم جميع خلايا الجهاز المناعي في الأفراد التي تتلقّى هذه الخلايا الجذعيّة بعد عمليات الاغتراس (Belvedere et al., 1999).

2-3. أهداف البحث:

1. عزل أكبر مردود ممكن من الخلايا CD34⁺ والمحافظة على حيويتها، والبحث عن الخلايا الأقلّ نضجاً المفيدة في الغرسات طويلة الأمد .
2. تحديد الوسط المثالي لإكثار الخلايا الجذعية المولّدة للدم خارج الكائن الحي
3. اختبار قدرة الخلايا الجذعية CD34⁺ المعزولة من دم الحبل السري البشري في هذه الدراسة على التّمايز إلى خط خلوي مُحدّد وحيدات/ بالعات كبيرة قبل تجميدها، وبعد فك تجميدها.

4-2. أهمية البحث:

1. الإشارة إلى حساسية أحد الطرائق المخبرية في عزل الخلايا الجذعية المولدة للدم.
2. المساهمة في فهم النمط المناعي غير المتجانس الذي يختلف باختلاف: طريقة عزل الخلايا ومصدر الخلايا.
3. التوصل إلى نوعية وسط استنبات مغذي يسمح بتكثير الخلايا خارج الكائن الحي.
4. تحليل نظام الوحيدات/ البالعات الكبيرة الوظيفي في الوسط الصناعي.

المواد والطرائق

Materials and Methods

3. المواد والطرائق Materials and Methods

3-1. عيّنات دم الحبل السريّ البشري

أُخِذَت عيّنات دم وريد الحبل السريّ لعدد من حالات الولادة القيصرية (16) والطبيعية (19) في مستشفى التّوليد وأمراض النّساء الجامعي بدمشق، بعد الحصول على موافقة مستتيرة من الأهل. تراوحت أعمار السيّدات بين 25 و38 عاماً، وتمّ تسجيل المعلومات الخاصّة بجنس المولود وعمر الأم وعدد الولادات. سُحِبَت عيّنات الدّم من وريد الحبل السريّ في شروط عقيمة بعد الولادة مباشرة. تمّ تجنّب ضياع الدّم من وريد الحبل السريّ بلقطه بملقط كوشر المعدني Kocher clamp قبل قصّه وفصله عن الجنين. وُضِعَت المشيمة المتصلة مع الحبل السريّ، في حالة الولادة القيصرية، على قاعدة عقيمة بحيث تكون المشيمة في الأعلى ويتدلّى الحبل السريّ منها نحو الأسفل للحصول على أكبر حجم ممكن من الدّم. أمّا في حالة الولادة الطّبيعيّة فقد سُحِبَت عيّنة الدّم من وريد الحبل السريّ والمشيمة لا تزال داخل الرحم. جُمِعَت عينة الدم باستعمال أكياس نقل الدّم أحاديّة تحوي سترات فوسفات دكستروز-أدينين (CPD-A) citrate phosphate dextrose- adenine كمحلول مانع للتخثر، ومُجَهّزة بإبرة خاصة لجمع الدّم. وحصلنا في كل مرة على حجم من الدّم يتراوح بين 80-150 ميلي لتر (92.72 ± 33.13). نُقِلَت العيّنات إلى المختبر في درجة حرارة الغرفة، وتمّ العمل عليها بعد حوالي ساعة من عمليّة الجمع.

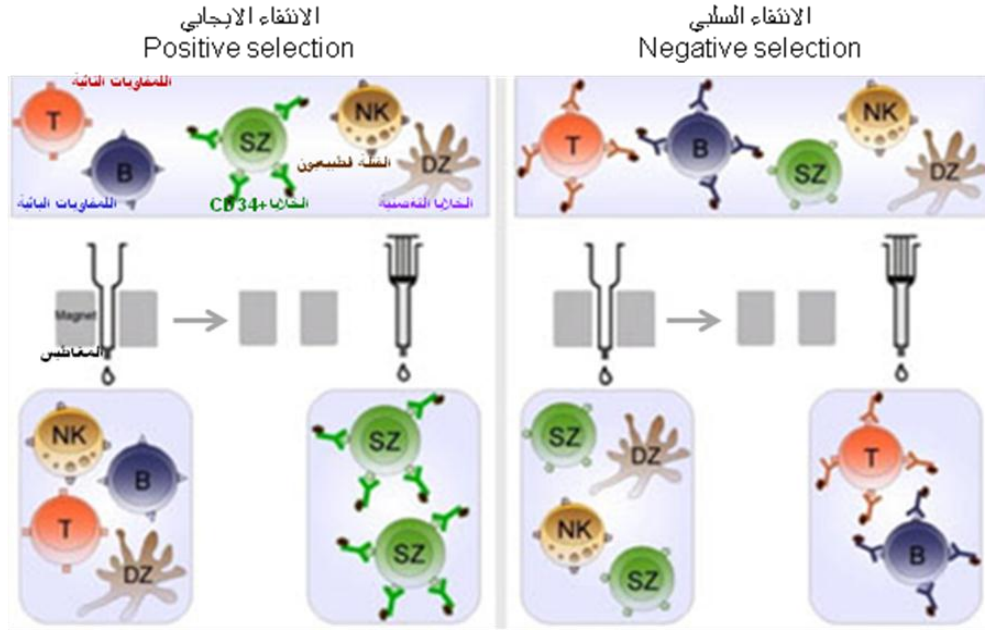
3-2. تحويل عيّنات دم الحبل السريّ إلى غلالة بيضاء

حُوِّلَت عيّنات دم الحبل السريّ البشريّ إلى ما يسمى بالغلالة البيضاء Buffy Coat بغية إغناء العيّنة بالخلايا، والتّخلص من أكبر جزء ممكن من الصّفيحات الدّموية وخلايا الدّم الحمراء، وذلك بنبذ الدّم بسرعة 1320 xg ولمدّة 10 دقائق في درجة حرارة 25 مئويّة. أهْمِل الطّافي، وجُمِعَت الغلالة البيضاء، ثمّ نُبِذَت بسرعة 61 xg مدّة 7 دقائق. وبعد طرح البلاسما، حصلنا على غلالة مُحَمَّرَة وصلت فيها نسبة الخلايا البيض إلى 90%.

3-3. الانتقاء المغناطيسي المناعي للخلايا الجذعية المؤددة للدم CD34⁺

تستعمل طريقة الفصل المغناطيسي المناعي Immunomagnetic separation لتنقية الجماعات الخلوية المختلفة حسب مستضداتها السطحية. وتسمح هذه الطريقة بفصل الخلايا الهدف بحضنها مع حبيبات نانوية ممغنطة مغلقة بالأضداد النوعية لمستضد سطحي محدد يعبر عنه على سطوح هذه الخلايا، مما يؤدي إلى ارتباطها إلى الحبيبات النانوية الممغنطة. ويُقل المعلق الخلوي بعد ذلك إلى عمود يوجد داخل مغناطيس خاص، فتلتصق الخلايا المرتبطة إلى الحبيبات والتي تعبر عن المستضد المعني إلى جدار الأنبوب بينما تبقى الخلايا الأخرى (التي لا تعبر عن هذا المستضد) معلقة في سائل الشطف. ويمكن استعمال هذه الطريقة لفصل الخلايا إما بالانتقاء الايجابي Positive Selection أو بالانتقاء السلبي Negative Selection، تستعمل في الانتقاء الإيجابي، أضداد نوعية لمستضد يوجد على سطوح الخلايا الهدف، فترتبط هذه الخلايا إلى جدار العمود، وتُجمع بعد التخلُّص من الخلايا المعلقة ثم يتم نزع العمود من داخل المغناطيس. بينما تستعمل في الانتقاء السلبي أضداد نوعية لمستضدات سطحية يُعرف بأنها توجد على سطوح الخلايا غير المعنية، وتُجمع الخلايا الهدف التي تبقى معلقة من سائل الشطف، بينما ترتبط الخلايا المراد التخلُّص منها إلى جدار العمود (الشكل 3-1). إنَّ الخلايا الناتجة يمكن استعمالها مباشرة لتحليلها باستعمال تقنية قياس الجريان الخلوي، أو تحليلها جزيئياً، أو استنباتها بغية تكثيرها، أو تحريض تمايزها، لأغراض تخدم أبحاث التطبيقات العلاجية الخلوية السريرية.

الفصل المغناطيسي المناعي للخلايا CD34+

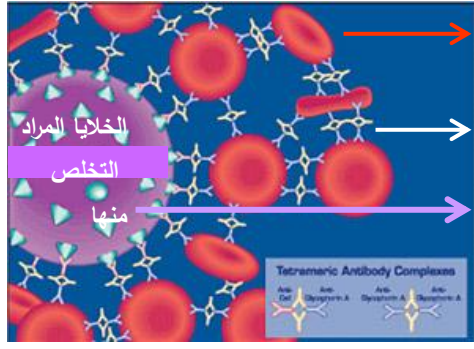


الشكل (1-3): مبدأ الفصل المغناطيسي المناعي للخلايا CD34+.

1-3-3. الانتقاء الإيجابي للخلايا الجذعية المؤددة للدم CD34+

أولاً- الإغناء الأولي للخلايا CD34+

تضمنت هذه المرحلة استعمال عتيدة مصممة للانتقاء الإيجابي، للخلايا الجذعية المؤددة للدم CD34+ من عيّنات دم الحبل السري البشري (EasySep™ human cord blood CD34 positive selection kit, Stem Cell Technologies, Canada)، احتوت مزيجاً استعمل للإغناء الأولي للخلايا الجذعية CD34+ (Human Cord Blood CD34 Pre-Enrichment Cocktail)، مكوّن من أعداد رباعيّة الجزيئاً Tetrameric Antibodies مهيّنة للارتباط من جهة مع خلايا الدم الحمراء ومن جهة أخرى مع الخلايا غير المرغوب بعزلها والتي لا تحمل الواسمة CD34 (الشكل 3-2). أُضيفَ هذا المزيج إلى عينة الغللة البيضاء بتركيز قدره 5 ميكرو لتر/ ميلي لتر، وحُضِنَت مدّة 10 دقائق، في درجة حرارة الغرفة، ثمّ فُصِلَت الوجيدات بالنّبذ على وسط الفيكول.



الخلايا الحمر

الأضداد رباعية الجزيئات

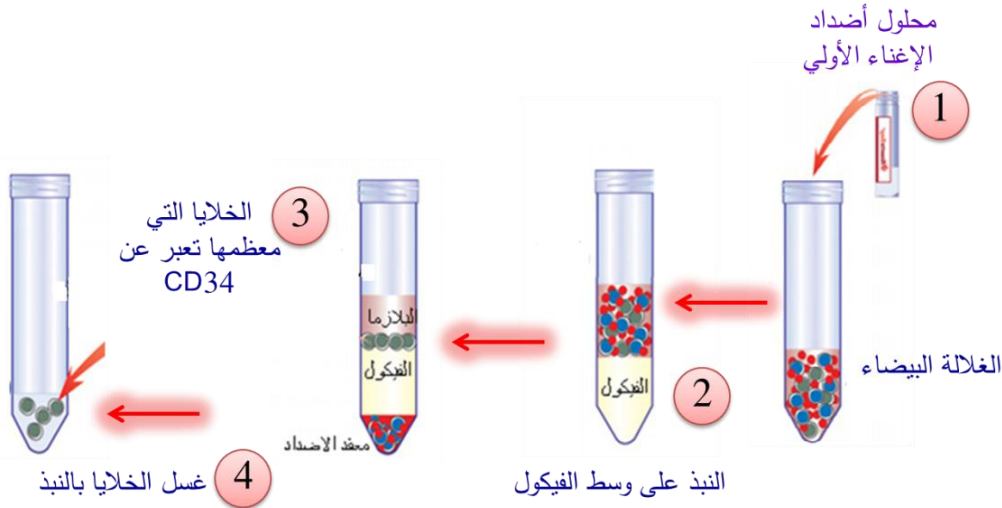
الخلايا غير المرغوب بعزلها

الشكل (2-3): شكل ترميمي يوضح المعقد الناتج عن ربط الأضداد رباعية الجزيئات للخلايا التي لا تحمل الواسمة CD34 من جهة و لخلايا الدم الحمر من جهة اخرى.

ثانياً- فصل الوَحِيدَات البشرية Human Mononuclear cells

فُصِلَت الوَحِيدَات، من العَيِّنة بعد إِغْنائِها الأوَّلِي بالخلايا $CD34^+$ ، بطريقة النَّبْذ على وسط الفيكول. وتعد هذه الطريقة بسيطة وسريعة ولا تُغَيِّر من شكل الوَحِيدَات المعزولة أو من وظائفها. ويعتمد مبدأ هذه الطَّرِيقَة على الاختلاف في الكثافة بين الوَحِيدَات ومكوِّنات الدَّم الأخرى؛ فتنوَّضَع الوَحِيدَات وما تَبَقَّى من الصُّفِيحَات الدَّمَوِيَّة على السَّطْح العلوي لطبقة الفيكول بسبب كثافتها المنخفضة. وعلى العكس فإنَّ خلايا الدَّم الحمر والمحبِّبات هي ذات كثافة تزيد على كثافة الفيكول لذلك تتواجد أسفل طبقة الفيكول. مُدِّدَت العَيِّنة، بعد إِغْنائِها الأوَّلِي بالخلايا $CD34^+$ ، بوقاء ملحي فسفاتي PHosphate-Buffered Saline (PBS) خالي من شوارد الكالسيوم والمغنزيوم (DPBS, HyClone ®) وبنسبة 1:1 في أنابيب نبذ مخروطية القاعدة حجمها 50 ميلي لتر، وُنَبِّدَت على وسط فيكول تركيزه 1.077 غرام/ ميلي لتر. (Ficoll-paque plus, Stem Cell Technologies, Canada) بسرعة 400 xg مدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة. جُمِعَت الطَّبَقَة التي تعلو الفيكول والتي تحوي المكوِّنات الخلوية الغنيَّة بالخلايا $CD34^+$ ، وُعْصِلَت الخلايا بالنَّبْذ ثلاث مرَّات؛ مرَّةً بسرعة 300 xg ومرَّتين بسرعة 120 xg مدة 10 دقائق في كل مرَّة في درجة حرارة 25 مئويَّة، بالوقاء الملحي الفوسفاتي المُدعَّم بـ 2% من مصل جنين البقر (Fetal Bovine Serum (FBS); EuroClone, Italy) بعد تخريب بروتينات جملة المتممة بالحرارة (التسخين في الدرجة 56 مئوية مدة 30 دقيقة)، ويحوي مضادَّات حيوية (100 وحدة دولية/ ميلي لتر من

بنسلين/ستربتومايسين (Stem Cell Technologies, Canada) Penicillin/Streptomycin، والمضاد الفطري (Euroclone, Italia) Amphotericine، و 1 ميلي مول EDTA الشكل (3-3). إن تكرار عملية الغسل أدى إلى التخلص من الصفيحات التي عادة ما ترتبط إلى الوحيدات أثناء فصلها بالنبذ على الفيكول.



الشكل (3-3): مخطط يوضح طريقة الإغناء بالخلايا $CD34^+$ ، باستعمال عتيدة تحتوي مزيج للإغناء الأولي بالخلايا $CD34^+$ من دم الحبل السري البشري، ومن ثم فصلها حسب كثافتها بالنبذ على وسط فيكول تركيزه 1.077 غرام/ميلي لتر.

حُضِرَ مُعَلَّقُ خُلُوي تركيزه 2×10^8 خلية/ميلي لتر من وقاء PBS، وتمّ تقييم حيويّة الخلايا cell viability وعددها.

وتجدر الإشارة إلى أنّ جميع المحاليل المستعملة تمّ تمريرها عبر مرشحات ذات مسامات قطرها 0.22 ميكرومتر (Sartorius stedim biotech, Germany)، بينما عُفِّمَتِ الحجم الكبير من المحاليل في المعقمة الرطبة (JSR, China)، كما عُفِّمَتِ الأدوات التي على تماس مع الخلايا في المعقمة الجافة (Heraeus, Germany)، وأجريت كل المراحل في خيمة الزرع من الصّف الثاني (Class II laminar flow hood; OSK, Japan).

ثالثاً- تنقية الخلايا CD34⁺

حُصِنَت الخلايا وَحيدات النوى مع أضداد فأريّة وحيدة النَّسيلة ضد-مستقبلات منطقة الشدفة
Crystallizable Region (Fc region) FC fragment البشريّة
(mouse anti-human Fc receptors CD64/CD16/CD32; BD Biosciences, USA)
وذلك بمعدّل 67 ميكرو لتر / 10×10^6 خلية/ ميلي لتر من وقاء PBS (3 ميلي غرام/ ميلي لتر)، مدة 10
دقائق على التّلق بغيّة إشباع مستقبلات الشدفة Fc وبالتالي تجنّب الارتباط غير النّوعي للأضداد. غُسِلَت
الخلايا بالتّذب بسرعة 970 xg مدّة ثلاث دقائق، ثمّ أُضيفت الأضداد وحيدة النَّسيلة التّوعيّة للواسمة CD34
(Stem cell technologies, Canada)، وبمعدّل 100 ميكرو لتر من الأضداد لكل واحد ميلي لتر من
المعلّق الخلوي (2×10^8 خلية)، ومزجت المكوّنات على هزّارة (Stuart SB2, UK)، ثمّ حُصِنَت مدّة
15 دقيقة في درجة حرارة 25 مئويّة.

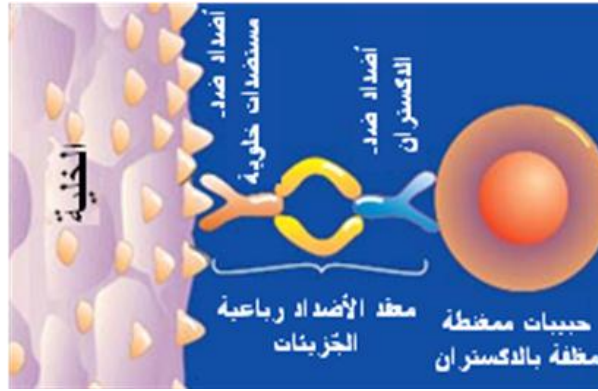
أُضيف 50 ميكرو لتر من الحبيبات المُمغنطة النّانويّة (التي لا تُقرأ بجهاز قياس الجريان الخلوي ولا
تؤدي إلى إشارات كاذبة) لكل واحد ميلي لتر من المعلّق الخلوي (2×10^8 خلية)، وحُصِنَت مدّة 15
دقيقة إضافيّة مع التّحريك المستمر وفي نفس درجة الحرارة. كُمَل حجم العيّنة بالوقاء الملحي الفوسفاتي
المُدعّم حتى 2.5 ميلي لتر. أُخضع المزيج لمدة 5 دقائق لحقل مغناطيسي بوضعه في عمود يوجد داخل
مغناطيس خاص (EasySep™ magnet; Stem Cell Technologies, Canada) بعد غسل العمود
بوقاء PBS، فالتصّقت الخلايا CD34⁺ التي ارتبطت إلى الحبيبات المُمغنطة إلى جدار الأنبوب، بينما
بقيت الخلايا الأخرى معلّقة في سائل الشّطف. قُلِبَ المغناطيس وبداخله العمود وبحركة واحدة تمّ التخلّص
من الخلايا المعلّقة التي لا تحمل الواسمة CD34⁺، بينما بقيت الخلايا CD34⁺ داخل العمود ملتصقة إلى
جداره الشكل: (3-4). كرّر تمرير المعلّق الخلوي على العمود من ثلاث إلى أربع مرّات لزيادة نقاوة الخلايا
CD34⁺ المعزولة، وفُصِلَت عمليّات تمرير الخلايا على المغناطيس بالغسل بـ 2.5 ميلي لتر من الوقاء
PBS المُدعّم، وأخيراً علّقت الخلايا الجذعيّة CD34⁺ المعزولة في وسط الاستنبات الخلوي
(Sigma, Germany) Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM).



الشكل (3-4): مخطط يوضح مراحل تنقية الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34⁺ بطريقة العزل المغناطيسي المناعي لفصل الخلايا بالانتقاء الإيجابي.

2.3-3. الانتقاء السلبي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34⁺

استعمل في هذا النمط من الانتقاء عتيدة مصممة للانتقاء السلبي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34⁺ وسليقاتها من عينات دم الحبل السري البشري (EasySep™ human progenitor cell enrichment cocktail with platelet depletion; Stem Cell Technologies, USA). عملت مكونات العتيدة على التخلص من جميع أنماط خلايا الدم ومن الصفائح بعية تنقية الخلايا CD34⁺. وتتكون هذه العتيدة من مزيج من الأضداد الفأرية من تحت الصف IgG1 وحيدة النسيلة ثنائية النوعية رباعية الجزيئات، ربطت من جهة الدكستران المغلف للحبيبات الممغنطة ومن جهة أخرى مستضدات اللمفاويات التائية T lymphocytes (CD2، CD3)، أو اللمفاويات البائية B lymphocytes (CD19، CD24)، أو خلايا القتل الطبيعيون NK (CD2، CD56، CD16)، أو الوحيدات (CD14، CD11b، CD11c)، أو خلايا الدم الحمراء (Glycophorin A)، أو الصفائح الدموية والخلايا كبيرة التوتة Megakaryocytes (CD61)، أو العدلات Neutrophils والولوعات بالإيزين Eosinophils (CD66b)، الشكل: (3-5).



الشكل (3-5): شكل ترسمي يوضح معدن الأضداد ثنائية النوعية رباعية الجزيئات التي تربط خلايا لا تحمل الواسمة CD34 من جهة والدكستران المُغلف للحبيبات المُمَغَنَظَة من جهة أخرى.

أُشْبِعَت المَواقِع غير النُوعية للارتباط كما هو الحال في الانتقاء الإيجابي، ثم أُضيف 50 ميكروتر من مزيج أضداد الإغناء لكل واحد ميلي من المُعَلَّق الخلوي (5×10^7 خلية/ميلي لتر من الوقاء الملحي الفوسفاتي المُدَعَم) بعد فصلها على الفيكول وفقاً لنفس الشُروط الواردة أعلاه، وحُضِنَت في درجة حرارة الغرفة مدة 15 دقيقة مع التَّحريك المستمر على هزَّارة. ثم أُضيفت الحبيبات التَّانُويَّة المُمَغَنَظَة المُغَلَّفة بالدكستران من نوع D.M. particles بمعدَّل 100 ميكروتر/ميلي لتر من المُعَلَّق الخلوي، وجُونِسَت المكونات بمزجها جيداً مدة ثلاثين ثانية، وحُضِنَت في درجة حرارة الغرفة مدة 5 دقائق إضافية مع التَّحريك المستمر، مما أدَّى إلى تشكُّل معقدات تتكون من الأضداد رُباعيَّة الجزيئات Tetrameric Antibody Complexes (TAC) التي ترتبط من جهة بالخلايا المراد استنفادها ومن جهة أخرى بالحبيبات المُمَغَنَظَة المُغَلَّفة بالدكستران. كُمِّل حجم العينة حتى 2.5 ميلي لتر بالوقاء الملحي الفوسفاتي المُدَعَم، ومُزِجَت العينة برفق بواسطة الماصَّة المِكرُويَّة. عُسِلَ العمود المخصَّص لفصل الخلايا على المغناطيس بوقاء PBS، ووضعت العيَّة في العمود، وحُضِنَت مكوناتها داخل المغناطيس مدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة، لتلتصق الأنماط الخلويَّة غير المرغوب بعزلها والمرتبطة بالحبيبات المُمَغَنَظَة إلى جدار الأنبوب الملامس للمغناطيس، وتبقى الخلايا $CD34^+$ المراد عزلها مُعلَّقة في وسط الأنبوب. ثم قُلبَ الأنبوب وهو داخل المغناطيس بحركة واحدة، وحُفِظَت محتوياته غير المرتبطة (الخلايا $CD34^+$) في أنبوب جديد، بينما أهمل محتوى أنبوب العينة بعد نزعها من المغناطيس (معدن الخلايا والحبيبات الغير

مرغوب بعزلها) الشكل: (3-6) تُبَدَّت الخلايا الجذعية $CD34^+$ المعزولة بسرعة 400 xg مدة 10 دقائق، ثم عُلِّقَتْ في وسط استنبات IMDM.



الشكل (3-6): مخطط يوضح مراحل تنقية الخلايا الجذعية المؤلدة للدم $CD34^+$ بطريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي السليبي.

تمّ تقييم فعالية عملية الفصل المغناطيسي المناعي للخلايا $CD34^+$ من دم الحبل السري البشري بكلتا طريقتي الانتقاء الإيجابي والسليبي، بتقييم عدد الخلايا $CD34^+$ وحيويتها بطريقة استبعاد صبغة التريبان الأزرق trypan blue dye exclusion test. واستعملت تقنية قياس الجريان الخلوي لتقييم خصائص الخلايا المعزولة.

3-4. تقييم حيوية الخلايا وعددها

تم تقييم حيوية الخلايا باستعمال صبغة التريبان الأزرق Trypan blue الذي يكشف عن الخلايا الميتة والخلايا ذات الأغشية المتضررة التي تفقد قدرتها على استبعاد هذه الصبغة؛ فتسمح الخلايا ذات الأغشية المتضررة للصبغة بالنفوذ إلى داخل سيتوبلاسماها وتتلون باللون الأزرق، بينما تستطيع الخلايا الحية غير المتضررة استبعاد هذه الصبغة فلا تتلون بها (Mishell and Shiigi, 1980).

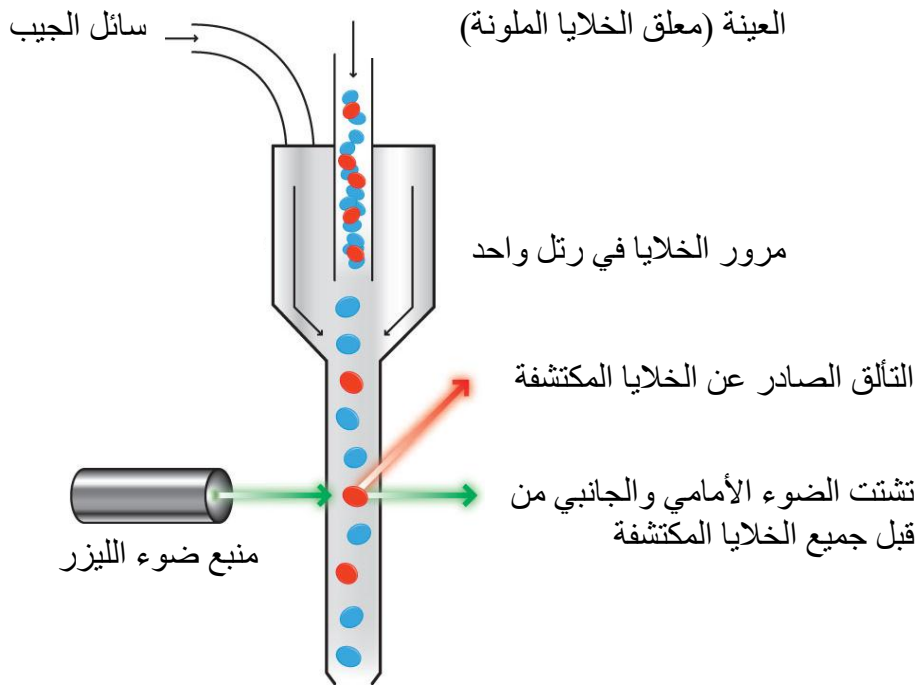
استُعمِلت هذه الطَّريقة لتقييم عدد الخلايا وحيويَّتها خلال مراحل الفصل المختلفة؛ حيث حُضِر مُعلَّق خلوي تركيزه 2×10^8 خلية/ميلي لتر من وقاء PBS، وأُضيف محلول التريبان الأزرق (Sigma, Germany) بتركيز قدره 0.4%. وُعِدَّت الخلايا بوضع 10 ميكرو لتر من المعلق الخلوي في عِدَادَة المالاسيز (Mallasses; Germany)؛ وتمَّ عد حوالي 200 خلية باستعمال المجهر الضوئي (Olympus, Japan) وبتكبير 400 مرَّة. وحُسِبَت النسبة المئويَّة للخلايا الحيَّة حسب المعادلة التَّالية:

$$\% \text{ للخلايا الحية} = \frac{\text{عدد الخلايا الحية}}{\text{مجموع عدد الخلايا}} \times 100$$

3-5. تنميط الخلايا بتقنيَّة قياس التدفق الخلوي

أولاً- مبدأ التقنيَّة

تعتمد تقنيَّة قياس الجريان الخلوي على نظام جريان الخلايا في وسط سائل لتمر على شكل رتل واحد أمام ضوء الليزر، فينتج عن ذلك تشتُّت للضوء light scatter وتألُّق light fluorescence ذو خصائص تتعلَّق بالصفَّات الخاصَّة بكل نمط خلوي الشكل (3-7). وبالتالي فإن تحليل الخلايا باستعمال هذه التقنيَّة يسمح بتحديد خصائص الخلايا (الحجم، ودرجة التحبُّب Granularity، وتحديد المستضدَّات السطحيَّة للخليَّة)، والتبدُّلات في الخصائص (محتوى الخلية من الـ DNA، النشاط الإنزيمي الخلوي، درجة الحموضة pH) (Roederer M., 1997; Givan A., 2001). كما يمكن بهذه التقنيَّة تمييز تحت جماعات خلوية معيَّنة توجد ضمن جماعات خلوية متغايرة، وفصلها بنقاوة عالية تبلغ حوالي 98%، وبشروط عقيمة تسمح باستعمال هذه الجمهرة الخلوية في تطبيقات الاستنبات الخلوي (Recktenwald DJ., 1993).



الشكل (3-7): مخطط ترسمي لحجرة الجريان في جهاز قياس التدفق الخلوي.

في هذا البحث، استُعملت هذه التقنية في البداية لتحليل المستضدات الخلوية الغشائية التي تُعبر عنها خلايا المراحل المختلفة من العزل من دم الحبل السري البشري بطريقة الفصل المغناطيسي المناعي بنوعيه الإيجابي والسلبي. واعتمدت طريقة التلوين الرباعية لتحديد الخلايا $CD34^+$ وتحت مجموعاتها الخلوية السليفة الأقل نضجاً وتحليلها، وذلك باستعمال أعداد وحيدة النسيلة نوعية لمستضدات هذه الخلايا مقرونة بأصبغة قابلة للتألق.

ثانياً- الأعداد وحيدة النسيلة المستعملة في التَّميظ

استُعملت مجموعة من الأعداد وحيدة النسيلة الفأرية الموجهة ضد-مستضدات خلوية بشرية ومقرونة بأصبغة قابلة للتألق، وتم متابعة التعبير المتزامن للمستضد $CD34$ مع مستضدات سطحية أخرى تُميز تحت الجماعات الخلوية الغنية بالخلايا السليفة أو الأولية المبكرة، تتضمن: $CD45$ ، و $CD38$ ، و $HLA-DR$ ، و $CD33$ ، و $CD117$ ، و $CD123$ ، و $CD105$. كما استُعملت أعداد وحيدة النسيلة أخرى نوعية لواسمات خلايا الدم الناضجة؛ تتضمن واسمات اللَمفاويات البائية ($CD19$) والتائية ($CD3$) - ($CD4$ و $CD7$) وخلايا القتل الطبيعيين ($CD56$)، بالإضافة إلى واسمات الخلايا الوحيدات والبالعات ($CD14$ و $CD15$ و $CD11c$ و $CD13$ و $CD64$)، والواسمة المميزة للخلايا العَدلات $CD10$ ممّا سمح

بتقييم فعالية طريقة العزل المناعي المغناطيسي للحصول على مردود مرتفع من الخلايا $CD34^+$ والتأكد من استنفاد جميع خلايا الدم الناضجة التي لا تحمل هذه الواسمة الجدول (1-3).

الجدول (1-3) قائمة بالأضداد وحيدة النسيلة المستعملة للتثمين المناعي للخلايا المعزولة ونوع الصبغة التألقية المقرونة بالضد والشركة المنتجة.

الضد وحيد النسيلة	النمط الخلوي الذي يعبر عن الواسمة CD	الصبغة التألقية	الشركة المنتجة
Anti-CD34	الخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs	FITC, PE	BD Pharmigen, USA
Anti-CD45	خلايا الدم البيض Leukocytes	FITC, PE APC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD117	الخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs (مستقبل SCF)	APC, PE	BD Pharmigen, USA
Anti-CD105	الخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs	FITC	Invitrogen, USA
Anti-CD123	الخلايا الجذعية المولدة للدم HSCs (مستقبل IL-3)	PE-Cy5, FITC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD38	خلايا الدم البيض Leukocytes	FITC, APC	Invitrogen, USA
Anti-CD33	التقويات Myeloid cells	PE-Cy5, FITC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD19	اللمفاويات البائية B cells	PE-Cy7, APC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD56	القتلة الطبيعيون NK Cells	PE, APC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD4	الخلايا التائية T cells	PE	BD Pharmigen, USA
Anti-CD3	الخلايا التائية T cells	APC	BD Pharmigen, USA
Anti-HLA-DR	خلايا الدم البيض Leukocytes	PE, FITC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD7	الخلايا التائية T cells	PE-Cy5	BD Pharmigen, USA
Anti-CD10	العدلات Neutrophiles	PE-Cy5	BD Pharmigen, USA
Anti-CD11c	الوحدات Monocytes	PE	BD Pharmigen, USA
Anti-CD64	الوحدات Monocytes	FITC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD13	الوحدات Monocytes	PE .APC-Cy7	BD Pharmigen, USA
Anti-CD14	الوحدات Monocytes والبالعات Macrophages	PE-Cy5, PE, FITC	BD Pharmigen, USA
Anti-CD15	الوحدات Monocytes	APC-Cy7	BD Pharmigen, USA

حُضِرَ، في أنابيب إيندورف، كميات مناسبة من تركيبات تشاركية مختلفة من الأضداد تتكون كل منها من أربعة أضداد. وأخذ بعين الاعتبار أن تكون الأضداد في التركيبة الواحدة مقرونة بأصبغة قابلة للتألق مختلفة (الفلوريسين ايزو تيو سيانات Fluorescein Isothiocyanate (FITC)، أو الفيكوايريثرين Phycoerythrin (PE)، أو فيكوايريثرين-سيانين5 (Per-Cy5) Phycoerythrin and a cyanine5، أو فيكوايريثرين-سيانين7 (Per-Cy7) phycoerythrin and a cyanine7، أو الألوفيكوسيانين (allophycocyanin (APC))، تُثار عند استعمال ليزر الأرجون بأطوال موجات مختلفة فتصدر تألقاً ذو ألوان مختلفة (الجدول 2-3).

الجدول (2-3) الأصبغة التألقية المقرونة بالأضداد المستعملة في التنميط المناعي.

الصبغة التألقية	طول موجة استثارة الليزر (نانومتر)	طول موجة الإصدار (نانومتر)
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	488	525
R-phycoerythrin (PE)	488	575
R-phycoerythrin-cyanin5 (PE-Cy5)	488	670
R-phycoerythrin-cyanin7 (PE-Cy7)	488	767
Allophycocyanin (APC)	633	660
Allophycocyanine-cyanin7 (APC-Cy7)	633	767

ثالثاً- الشواهد

استُعملت الشواهد اللازمة لتنميط الخلايا الجذعية $CD34^+$ المؤلدة للدم وسليقاتها المبكرة؛ فاستعمل شاهد النمط المثل Isotype control الذي يتكوّن من غلوبولينات مناعية من الصّف IgG مقرونة بأصبغة تألقية (IgG1-FITC و IgG2b-PE و IgG2a-Cy5 و IgGa-APC)، واعتبر كشاهد سلبي يضبط التألق غير النوعي. كما استعمل شاهد التألق الذاتي للخلايا؛ وهو عبارة عن معلق من الخلايا المدروسة غير مرتبطة بأيّ من الأضداد التألقية. إنّ جميع هذه الأضداد حصلنا عليها من شركة (BD Biosciences, USA).

رابعاً- تحضير العينات

حُضِرَت عَيِّنَات من خلايا المراحل المختلفة للعزل المغناطيسي المناعي، ووُزِعَت العَيِّنَات في أنابيب خاصة بجهاز قياس الجريان الخلوي وبمعدل 1×10^5 خلية/ الأنبوب/ 100 ميكرو لتر من الوقاء الملحي الفوسفاتي. ولتجنُّب وجود تكتلات خلوية تمَّ مزج الخلايا بالتقلُّب اللطيف أو تمريرها عبر مرشحات خلوية عقيمة ذات ثقوب قطرها 30 ميكرو متر (Dako, Denmark). نُبِذَت الخلايا بسرعة 970 xg مدَّة ثلاث دقائق، وأُهمِلَ الطَّافِي، بينما غُسِلَت الخلايا بـ 3 ميلي لتر من وقاء PBS المُدَعَّم بـ 2% من FBS و 1 ميلي مول EDTA، وبالنبذ بنفس السرعة والمدَّة الزمنية. أُشِيعَت المواقع غير النوعية لارتباط الأضداد على سطوح الخلايا بحضن الخلايا مع الأضداد وحيدة النسيلة المضادة لمستقبلات الشدفة Fc (أضداد ضد-CD64/CD16/CD32)، وذلك بمعدل 67 ميكرو لتر/ 1×10^6 خلية/ ميلي لتر من وقاء PBS، مدَّة 10 دقائق على التَّلج، ثمَّ غُسِلَت الخلايا بالنَّبذ بسرعة 970 xg مدَّة ثلاث دقائق.

وللتَّحري عن عدَّة مستضدات سطحية للخلية نفسها وفي الوقت نفسه، حُضِرَ في أنابيب إيندورف تركيبات تشاركية مختلفة، تتكوَّن من أربعة أضداد وحيدة النسيلة نوعية لمستضدات خاصة بخط خلوي لمفي أو نقوي، تضمَّنت في كلِّ منها الضد-الواسمة CD34، شريطة أن تكون مقرونة بأصبغة تألقية مختلفة. مُزجت أضداد العَيِّنَات والشواهد قُبيل استعمالها مباشرةً وفي مكان خافت الإضاءة وعلى التَّلج، وأُضيفت إلى الخلايا بمعدل 20 ميكرو لتر من الأضداد لكل مليون خلية مُعلَّقة في واحد ميلي لتر من الوقاء الملحي الفوسفاتي، وحُفِظَت على التَّلج وبعيداً عن الضوء مدَّة 30 دقيقة تسمح بتثبيت الأضداد على الخلايا بشكل نوعي، ثمَّ غُسِلَت الخلايا بالوقاء الملحي الفوسفاتي بالنَّبذ بسرعة 970 xg مدَّة ثلاث دقائق للتخلُّص من الأضداد غير المرتبطة.

ولزيادة الارتباط النَّصالي بين الأضداد ومستضداتها وتحييد أي عوامل مرضية محتملة، وتُبَيَّنَت الخلايا بإضافة 0.5 ميلي لتر/ أنبوب من محلول بارافورم الدهيد تركيزه 1%، وتُرِكَت في الظلام وفي الدَّرجة 4 مئوية مدَّة ساعة. كما تمَّ التخلُّص من ما تبقى من خلايا الدَّم الحمراء المرافقة للخلايا المنقَّاة، والتي قد تؤثر في نتائج التَّحليل، بإضافة 2 ميلي لتر من المحلول الحال لهذه الخلايا lysing reagent (9.98 ميلي مول من بيكربونات البوتاسيوم KHCO_3 ، و 154 ميلي مول من كلوريد الامونيوم NH_4Cl ، و 9.93 ميلي مول من EDTA، والرقم الهيدروجيني 7.4 pH)، وتمَّ الحضن مدة دقيقة إلى دقيقتين، ثمَّ تمَّ

التخلص من أشلائها بالغسل بـ 3.5 ميلي لتر من الوقاء الملحي الفوسفاتي وبالنبذ بسرعة 970 xg مدّة 3 دقائق، وطُرح الطّافي. ومن الجدير بالذّكر أنّه تمّ حفظ جميع العينات على التّلج خلال عمليّة الفرز على جهاز قياس التدفق الخلوي.

خامساً: معايرة جهاز قياس التدفق الخلوي وضبط جودته

ضُبِطت إعدادات الجهاز بالتمرير الدوري لكريات مجهرية رباعيّة الألوان (BD Calibrite™ Calibrite 3 (cat. 340486) and APC (cat. 340487) beads)، باستعمال برنامج FACSCComp. كما ضُبِطت جودة الجهاز بالتمرير الأسبوعي لعينة دم محيطي طبيعيّة بعد معالجتها بمجموعة من الأضداد ضدّ الواسمات التالية: CD45 و CD3 و CD8 و CD4. وقُبيل تمرير العينات المراد تنميطها، تمّ تحديد نافذة التمرير استناداً إلى معلمي الحجم والتحبّب لاستبعاد الأشلاء الخلويّة المتبقية في العينة. كما تمّت برمجة مدّة تمرير العينات ليمر في هذه النافذة 10000 خلية (حادثة) من كل أنبوب للعينة الخلويّة.

سادساً: تمرير العينات في جهاز قياس التدفق الخلوي

مُرّرت عينات الخلايا المنقاة من دم الحبل السريّ البشري في جهاز قياس الجريان الخلوي FACS المجهّز بليزرين (448 and 635 nm; Becton Dickinson, USA)، والذي يسمح بتحليل أربعة أصبغة تألفية مختلفة في آن واحد. وبالتوازي مع تمرير هذه العينات تم تمرير العينات الشاهدة. ودُرست حوالي عشرة آلاف حادثة على الأقل لتوصيف الخلايا المعزولة وتحديد درجة نقاوتها ونسبها المئوية. يقوم جهاز قياس الجريان الخلوي بتمرير الخلايا على شكل رتل أحادي أمام المصدر الضوئي ليصطدم الضوء بالخلية، ينعكس أو يتشتت light scatter بطريقة نوعيّة لكل نمط خلوي. ويكون هذا التشتت للضوء إما تشتتاً أمامياً (FSC) Forward Scatter light نتج عن مرور الضوء عبر سطح الخلية فيعطي فكرة عن حجم الخلية، أو تشتتاً جانبياً (SSC) Side Scatter light يعبر الخلية وانعكاسه بعيداً بزوايا قائمة يُعبّر عن المكونات الداخليّة للخلية. ويُقاس كلا التشتتين بمكشافات الجهاز الضوئية. كما أنّ اصطدام الضوء ذي طول الموجة المحدد بالخلية يؤدي إلى استثارة الأصبغة القابلة للتألّق فتصدر ضوءاً تألقياً Fluorescence Light بطول موجة يختلف باختلاف الصبغة المستعملة، وهو يشير إلى

ارتباط الضد وحيد التسيلة مع مستقبله النوعي. ويرشح الضوء الصادر بعد ذلك عبر مرشح ضوئية نوعية لطول الموجة الصادرة، فنقوم بنقل أطوال أمواج محددة من الضوء وتعكس الأخرى لتمر عبر أنابيب المضخم الضوئي الذي يُحوّل الضوء المنعكس إلى إشارة كهربائية يتم اختطاطها على شاشة الكمبيوتر، ليتم تحليل البيانات الناتجة رياضياً باستعمال برامج حاسوبية خاصة.

سابعاً- تحليل البيانات

تمّ تحليل البيانات الأولية للعينات المدروسة في صفحة تحليل تم إنشاؤها باستعمال البرنامج الحاسوبي Pro-Cell Quest (Becton Dickinson, USA)؛ حيث تمّ تعيين التجمّهرات الخلوية المختلفة في العينة كل على حدى وذلك حسب مستضداتها الخلوية السطحية. ولإظهار قياسات الجريان الخلوي تم اختيار طريقة المنحنيات البيانية النقطية Dot Plot؛ حيث يعد هذا النوع من التمثيلات البيانية من أفضل التمثيلات للبيانات متعددة المعالم لتمييز تحت جماعات خلوية معينة ضمن جماعات خلوية غير متجانسة. وتقوم هذه الطريقة بتمثيل معلمين للخلية نفسها على مخطّط ثنائي البعد، وتُعبّر كل نقطة في هذا المخطّط عن مرور خلية واحدة خلال المكشاف، فتظهر الخلايا التي لها قيم متماثلة في أماكن متماثلة في ذلك المخطّط. لذلك تمّ تبويب Cell Gating كل جمهرة خلوية بحصر التمثيل النقطي البياني لجماعة خلوية محددة ضمن قطاع مُحدّد، ثمّ أظهرت التمثيلات البيانية لقياسات هذه الجمهرة دون غيرها من التجمهرات الخلوية التي عبّرت عن مستضدات مختلفة. وتمّ بهذه الطريقة تعيين التجمهرات الخلوية التي ضمّت تحت الجماعات الخلوية المختلفة للخلايا $CD34^+$ ($CD34^+CD45^+$ ، و $CD34^+CD38^+$ ، و $CD34^+CD38^-$ ، و $CD34^+HLA-DR^+$ ، و $CD34^+HLA-DR^-$ ، و $CD34^+CD33^+$ ، و $CD34^+CD117^+$ ، و $CD34^+CD123^+$ ، و $CD34^+CD105^+$). كما تمّ تعيين التجمهرات الخلوية الخاصة بخلايا الدّم النّاضجة، للتأكد من استنفاد خلايا الدّم غير المرغوب بعزلها ($CD4^+$ ، $CD7^+$ ، $CD3^+$ ، $CD19^+$ ، $CD56^+$ ، $CD14^+$ ، $CD13^+$ ، $CD15^+$ ، $CD64^+$ ، $CD11c^+$ ، $CD10^+$).

وكان من الضروري تقييم حيوية الخلايا أثناء تنميطها مناعياً لتجنّب تضمين الخلايا الميتة، والتي يُعرّف بأنها ترتبط الأضداد بشكل غير نوعي، في النسب المئوية للخلايا $CD34^+$ ، ممّا ينعكس على دقّة النتائج. تمّ تلوين عينة من الخلايا المنقّاة بـ 4.3 ميلي مول / اللتر من صبغة Propidium Iodide (Sigma, Germany) القابلة للتألّق والتي ترتبط بشكل نوعي إلى DNA بمعدّل 2 ميكرو ليتر لكل

مليون خلية ؛ فنلوتنت نُوى الخلايا الميَّنة نتيجة نفوذ الصبغة عبر غشائها السيتوبلازمي المتضرَّر، بينما لم تُعبَّر هذه الصبغة إلى نُوى الخلايا الحيَّة.

تمَّ تحليل البيانات الخاصَّة بالخلايا $CD34^+$ ، وحُسِبَت نسبتها المئويَّة لتحديد المردود الخلوي ونقاوة الخلايا، وذلك بتطبيق المعادلة التَّالية:

$$\% \text{ للخلايا } CD34^+ \text{ الحية} = \text{مجموع عدد الخلايا } CD34^+ \text{ المنتقاة الحية} / \text{العدد الكلي للخلايا (مجموع الخلايا الحية والميتة)} \times 100$$

كما تمَّ تحليل البيانات الخاصَّة بكلِّ جمهرة خلويَّة، وحُسِبَت النَّسب المئويَّة لكلِّ منها وبنفس الطَّريقة.

3-6. دراسة شكل الخلايا الجذعيَّة المُولَّدة للدم:

إنَّ لدراسة شكل Morphology الخلايا الجذعيَّة المُولَّدة للدم أهميَّة كبيرة ولأسباب مختلفة، تتمثَّل بتقديم أدلَّة حول سلامة الخلايا المعزولة، كما أنَّها خلال استنبات الخلايا وتحريضها على التمايز تشير إلى حالة الخلية (متمايزة أو غير متمايزة)، لذلك تُبْنَت، عيَّات من الخلايا المعزولة حديثاً بكلتا طريقتي العزل المغناطيسي المناعي، بالميتانول 95%، ثمَّ غُسِلَت بالماء المقطَّر، ولُوْنَت بغمِّها بملوَّن غيمزا (Sigma, Germany) Giemsa مدَّة عشر دقائق، ثمَّ غُسِلَت بالماء المقطَّر، وتمَّ فحص الخلايا باستعمال المجهر الضوئي وبتكبير قدره 1000 مرَّة. وُتِّقَت النَّتائج بالنقاط صُور نتيجة تزويد المجهر بآلة تصوير (Optica pro5, Italy) موصولة بحاسب وباستعمال برنامج خاص لالتقاط الصور (Optica vision pro5).

استُعْمِلَت، الخلايا الجذعيَّة المُولَّدة للدم $CD34^+$ المعزولة بكلتا طريقتي الانتقاء المغناطيسي المناعي والمُنْمَطة مناعياً بتقنية قياس الجريان الخلوي، في تجارب تكثير الخلايا وتحريضها على التمايز، وتمَّ تجميد الخلايا الفائضة.

3-7. توسيع الخلايا الجذعية CD34⁺

يحتوي دم الحبل السري على عدد محدّد من الخلايا الجذعية والخلايا السليفة، لذلك فمن الضروري اختيار شروط استنبات خارج الكائن الحي لتوسيع expansion الخلايا الجذعية CD34⁺، تسمح بالحصول على عدد كبير من الخلايا البنات التي تمتلك خصائص تجديدية ذاتية سوية تماثل خصائص الخلية الأم، والتي يمكن استعمالها في الدراسات البحثية والسريّة المختلفة.

استُنبتت الخلايا CD34⁺ المعزولة حديثاً من دم الحبل السري البشري والمنمّطة مناعياً في نوعين من الأوساط؛ الأول (IMDM) لاستنبات الخلايا بشكل عام خلال الليلة الأولى من الاستنبات بهدف التأكد من خلو العزلة الخلوية من التلوث البكتيري والتلوث الفطري، والوسط الثاني هو وسط استنبات نوعي للخلايا الجذعية CD34⁺ المؤلّدة للدم المعزولة من نقي العظم أو من دم الحبل السري أو الدّم المحيطي من صفاته أنّه خال من المصل (StemLine[®] hematopoietic stem cell expansion (medium; Sigma Aldrich, Germany) تمّ استبدال الوسط الأول (IMDM) به بعد التأكد من عدم تلوث العزلة الخلوية واستقرارها وذلك عن طريق جمع المعلق الخلوي ونبذه عند سرعة 250 xg. ودُعّم كلا الوسطين بـ 0.1 ميلي مول/ ميلي لتر من L-Glutamine و 25% من المصل البشري human serum (Sigma, Germany) أو 25% من مصل جنين البقر FBS بعد تخريب بروتينات جملة المتّممة بالحرارة (التسخين في الدرجة 56 مئوية مدة 30 دقيقة) أو كلا المصلين بتركيز قدره 12.5% لكل منهما. كما دُعّم الوسط بالمضادّات الحيوية (100 وحدة دولية/ ميلي لتر من بنسلين/ ستربتومايسين penicillin/streptomycin (Stem Cell Technologies, Canada). ولحض الخلايا على الإنقسام والحفاظ عليها بحالة فتيّة، أُضيف إلى وسط الاستنبات النوعي مزيج من عوامل النّمو والسيتوكينات المؤشّبة البشريّة، يتكوّن من: عامل الخلية الجذعية (SCF) stem cell factor (100 نانوغرام/ ميلي لتر)، والإنترلوكين-3 (IL-3) (50 نانوغرام/ ميلي لتر)، وربّيطة (Flt3) (fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L) (50 نانوغرام/ ميلي لتر).

في الأيام الخمسة الأولى من الاستنبات تمّ استنبات المجموع الكلي للخلايا الناتج عن العزل المغناطيسي ضمن طبق زرع خلوي سعة 3 ميلي لتر أو ضمن بئر واحدة من أطباق الزرع الخلوي ذات الستة آبار (6-well cell culture plates; TPP, Switzerland)، وبعد انقضاء الليلة الخامسة وُزعت الخلايا CD34⁺ في وبمعدّل 3×10³ خلية/ 2 ميلي لتر من وسط الاستنبات/ البئر، ووضعت في حاضنة

الإستنبات الخلوي (OSK, Tokyo) في درجة حرارة 37 مئوية و 5% ثاني أوكسيد الكربون CO2 ورطوبة 100%. زُوِدَت الخلايا، بعد 24 ساعة من الاستنبات، بمزيج عوامل النُّمو والسيتوكينات بالتركيبات المختلفة (وأخذَ بعين الاعتبار عيّنات شاهدة لا تحوي العوامل المحرّضة على الإنقسام)، وتمَّ إنماء الخلايا مدّة 7 أيّام دون تبديل وسط الاستنبات. نُقِلَت الخلايا بعد ذلك إلى فلاسكات بلاستيكية حجمها 25 سنتيمتر مكعّب (cell culture flasks 25 cm²; SPL life science, korea)، وكُمِّل حجم وسط الاستنبات المُدعّم بالسيتوكينات وعوامل النُّمو إلى 5 ميلي لتر، وأُعِدَّت إلى الحاضنة. تمَّ مراقبة تكاثر الخلايا بفحصها بالمجهر المقلوب (Olympus, Japan)، وعند وصولها إلى مرحلة 80-90% من النَّمادي الخلوي الأعظمي confluence، عُسِلَت بنبذها بسرعة 200 xg مدة 5 دقائق، وعُقِلَت في وسط الاستنبات المُدعّم بالمركّبات المُحرّضة على الإنقسام، وعُدَّت، وفُيِّمَت حيويّتها، ثم بُعِثَت بتوزيعها على فلاسكات أخرى مشابهة وبكثافة قدرها 3×10³ خلية/ ميلي لتر. تمَّ المحافظة على الخلايا بتبديل وسط الاستنبات بشكل دوري كل ثلاثة أيّام بالنَّبذ، واستبدال نصف حجم وسط الاستنبات بوسط جديد يحتوي السيتوكينات وعوامل النُّمو. وبعد مرور سبعة أسابيع من الاستنبات، جُمِعَت الخلايا الطّافية في الوسط، وجُرِفَت أيضاً الخلايا الملتصقة باستعمال 0.05% تريسين مضاف إليه 0.02% EDTA. وتمَّ لتحديد مدى فعالية نوع وسط الاستنبات المستعمل ومكوّناته في بُقيا الخلايا الجذعيّة المؤلّدة للدم خارج الكائن الحي، بعد الخلايا وتقييم حيويّتها وحُسِب تواتر تكاثر الخلايا في كلا الشُدُفَتَيْن الخُلويّتين الطّافية والملتصقة، ولتوثيق ذلك حُدِدَت أيضاً نسبة الزيادة في عدد الخلايا بتحليل مُحتوى هذه الخلايا من الDNA. وتمَّ التأكّد من أنّ الخلايا المتكاثرة حافظت في وسط الاستنبات على قدرتها على التّجديد الدّاتي لفترات طويلة وفي حالة فتية غير متميزة بدراسة نمطها الظاهري بالمجهر المقلوب، وتحليل نمطها المناعي بجهاز قياس التدفق الخلوي.

3.7.1. تقييم الزيادة في عدد الخلايا

حُسِبَ عدد الخلايا الكلي عند كل تمريره و بناءً عليه حُسِب تواتر تكاثر الخلايا بتحديد عدد مرّات الزيادة (Fold Increase (FI) في عدد الخلايا؛ والذي يُعبّر عنه بنسبة عدد الخلايا الحية النهائي في كل تمريرة إلى عدد الخلايا الأوّلي.

3. 7. 2. تحليل النمط المناعي للخلايا المستنبته.

بالتوازي مع عد خلايا الأيام 0، 7، 14، 21، 28، 35. من الإستنبات الخلوي وتحليل محتواها من DNA، ودراسة مظهرها تم أيضاً تمييزها مناعياً بتقنية قياس الجريان الخلوي وباستعمال جهاز FACS، ودُرست حوالي عشرة آلاف حادثة على الأقل لتوصيف الخلايا المتكاثرة بالاعتماد على التعبير عن الواسمات المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$ وسليقاتها المبكرة (CD45، وCD38، وHLA-DR، وCD33، وCD117، وCD123، وCD105). وتم تحليل نتائج التمييز باستعمال برنامج Cell Quest-Pro لتحديد عدد الجهرات الخلوية في الزراعات.

بعد استنبات الخلايا الجذعية $CD34^+$ والتأكد من قدرتها على التجدد الذاتي والبقاء في حالة فنية، تم التحرّي عن إمكانية توليد خلايا خط الوحيدات-البالعات الكبيرة اعتباراً من الخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$ وبأعداد كبيرة يمكن استعمالها في الدراسات البحثية والعلاجية المختلفة.

3. 8. تحريض تمايز الخلايا الجذعية $CD34^+$ إلى خلايا خط وحيدات النوى-البالعات الكبيرة

لتحديد فيما إذا كان بالإمكان توليد خلايا خط الوحيدات-البالعات الكبيرة، اعتباراً من الخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$ المعزولة من دم الحبل السري البشري، وبأعداد كبيرة يمكن استعمالها في الدراسات البحثية والعلاجية المختلفة. حُرّضت الخلايا $CD34^+$ على التمايز إلى خط الوحيدات/البالعات الكبيرة على مرحلتين: تمّ في المرحلة الأولى، توسيع الخلايا باستنباتها في صفائح ذات 6 آبار بمعدل $10^3 \times 3$ خلية/البئر/ 2 ميلي لتر من وسط الاستنبات النوعي للخلايا الجذعية المولدة للدم StemLine المدعم بـ 25% من مصّل جنين البقر وبوجود السيتوكينات المحرّضة على الإنقسام التي تضمّنت؛ 100 نانوغرام/ميلي لتر من عامل الخلية الجذعية SCF، و 50 نانوغرام/ميلي لتر من الإنترلوكين-3 IL-3، و 50 نانوغرام/ميلي لتر من ربيطة Flt3-L Flt3. وحُضنت الخلايا في حاضنة درجة حرارتها 37 مئوية و 5% من غاز ثاني أكسيد الكربون ورطوبة 100%. بعد حوالي 5 أيام من التوسيع، أُنجِزت المرحلة الثانية باستبدال وسط توسيع الخلايا بأخر مدعم بنفس العوامل والسيتوكينات المحرّضة على الإنقسام المذكورة أعلاه وبالتراكيز ذاتها، وأضيفَ إليها العامل المُنبّه لتجمّع الخلايا المُحبّبة - البالعات الكبيرة Macrophage colony-Stimulating Factor (M-CSF) والإنترلوكين-6 (IL-6) من شركة

(Sigma, USA) وبتركيز قدره 50 نانوغرام لكلٍ منهما. وأخذَ بعين الاعتبار عيّنات خلوية شاهدة لا يحتوي وسط استنباتها أيّ من العوامل المُحرّضة على الإنقسام أو المُحرّضة على التّمايز أو كليهما (شاهد سلبي). كما استعمل شاهد إيجابي تمثّل بخلايا وحيدات معزولة من الدّم المحيطي البشري ومستنبته في الوسط المغذي IMDM المُدعم بمصل جنين البقر (10%).

تمّ المُحافظة على الخلايا باستبدال نصف حجم وسط الاستنبات بوسط جديد مُدعم بالعوامل والسيتوكينات المُحرّضة على الإنقسام وتلك المُحرّضة على التّمايز باتجاه وحيدات كل 3 أيّام وحتىّ اليوم 35 من الاستنبات، تمّ خلالها مراقبة التّغيّرات الشكليّة للخلايا باستعمال المجهر المقلوب. كما تمّ تنميط الخلايا مناعياً في الأيام 0، و7 و14 و21 و28 و35 من الاستنبات؛ حيث جُمعت الخلايا المُعلّقة، واستعمل الترسين بتركيز قدره 0.05% مضافاً إليه 0.02% من EDTA لجرف الخلايا الملتصقة بعدّ حضانة مدّة خمس دقائق في الدرجة 37 مئوية، ثم أُضيفَ حجم مماثل من وسط الإستنبات المُدعم بـ 25% من مصل جنين البقر لتنشيط فعالية الترسين، ونُبذت جميع الخلايا بسرعة 200xg مدة 10 دقائق، وتُبعت بغسلها بالنّبذ في نفس الشّروط. وُرعت الخلايا بتركيز قدره 10^6 /ميلي لتر في أنابيب البوليسترين. ثم نُبذت بسرعة 790 xg مدة 3 دقائق. وتمّ التّحرّي عن التّعبير عن الواسمات ذات الصّلة بخلايا خط وحيدات النّوى-البالعات الكبيرة باستعمال أضداد وحيدة النّسيلة ضد- المستضد CD14 مقرونة بـ FITC وأضداد ضد- المستضد CD13 مقرونة بـ APC، وأضداد ضد- المستضد CD11c المقرونة بـ PE وأضداد ضد- المستضد CD10 المقرونة بـ PE، وأضداد ضد- مستضد CD15، وأضداد - ضد مستضد CD64 الجدول (3-3). تمّ تحليل نمط الخلايا المناعي بتمريرها على جهاز قياس الجريان الخلوي، ودُرِس حوالي عشرة آلاف حادّثة على الأقل، وتمّ تحليل نتائج التّتميط باستعمال برنامج Cell Quest-Pro لتحديد مرحلة التّمايز وحساب النّسبة المئويّة للخلايا المُتمايزة.

الجدول (3-3): قائمة بالأضداد وحيدة النسيلة المستعملة للتثمين المناعي للخلايا CD34+ أثناء تمايزها إلى خط وحيّات النوى-البالعات الكبيرة، ونوع الصبغة التألقية المقرونة بالضد والشركة المنتجة.

الشركة المنتجة	الصبغ المتألق	النمط الخلوي الذي يعبر عن المستضد	الضد وحيد النسيلة
Biosciences, USA	PE-Cy7	الوحيّات Monocytes والبالعات الكبيرة Macrophages	Anti-CD14
Biosciences, USA	PE, FITC		Anti-CD14
Biosciences, USA	APC-Cy7		Anti-CD13
Biosciences, USA	APC		Anti-CD13
Biosciences, USA	PE	الوحيّات Monocytes والبالعات الكبيرة Macrophages والعدلات Neutrophils	Anti-CD11c
Biosciences, USA	PE-Cy5	العدلات Neutrophils وطلائع البائيات B cells	Anti-CD10
Biosciences, USA	APC-Cy7	الوحيّات Monocytes والبالعات الكبيرة Macrophages	Anti-CD15
Biosciences, USA	FITC	الوحيّات Monocytes	Anti- CD64

ترافقت دراسة نمط الواسمات السطحية للخلايا المتميزة، دراسة شكل هذه الخلايا. أهمل السائل الطافي للخلايا الملتصقة في اليوم 21 للخلايا المنتقاة بطريقة العزل السلبي واليوم 35 للخلايا المنتقاة بطريقة العزل الإيجابي من الاستنابت والتمايز، ثم غسّلت الخلايا بوقاء PBS، وثبتت بإضافة 500 مكرو لتر من الكحول الميتيلي 95% بئر مدّة دقيقة واحدة. غسّلت الخلايا بالماء المقطر للتخلص من الكحول الميتيلي، ولوّنت بغمرها بصبغة غيمزا مدّة عشر دقائق، ثم أعيد غسلها بالماء المقطر، وفحصت الخلايا باستعمال المجهر الضوئي وبتكبير قدره 1000 مرّة، والتقطت صور للخلايا المتميزة.

3.9. تجميد Cryopreservation الخلايا الجذعية المولدة للدم CD34+ وإزالة تجميدها

Thawing

تمّ التّحرّي عن إمكانيّة حفظ عيّنات من الخلايا الجذعية المولدة للدم CD34+ المعزولة من دم الحبل السري البشري بتجميدها في درجات حرارة منخفضة ولفترة زمنية (5-6 أشهر)، بغية استعمالها لاحقاً في الدّراسات البحثية أو السريرية. أُخذت عيّنات من الخلايا الجذعية المولدة للدم CD34+ بعد عزلها مباشرة بطريقة العزل المغناطيسي المناعي والمنمّطة مناعياً بجهاز قياس الجريان الخلوي، وغسّلت الخلايا في وسط الاستنابت IMDM بنبذها بسرعة 200 xg مدّة 5 دقائق، ثمّ علّقت في نفس وسط

الاستنابات، وأضيفَ حجم مماثل من وسط التَّجميد المُبرَّد (وسط الاستنابات IMDM؛ يحتوي 20% مصل جنين البقر، و20% DiMethylSulfOxide (DMSO) ببطء وعلى شكل قطرات ومع التَّحرك المستمر ليصبح تركيزه DMSO النَّهائي 10%. وُزعت الخلايا بالنَّسأوي في أنابيب خاصَّة بالتَّجميد (Cryogenic vial; NalGene, UK)، وبمعدَّل 10×10^6 خلية/ميلي لتر/ الأنبوب، وتُرِكَت على النَّلج. نُقِلت الأنابيب بعد عشر دقائق، إلى عبوة الإيزوبروبانول (Thermo Scientific Cryogenic freezing container; NalGene, UK)، ووُضِعَت في مجمِّدة درجة حرارتها -20 مئويَّة مدَّة ليلة كاملة. نُقِلت بعد ذلك العبوة وبداخلها الأنابيب إلى مجمِّدة درجة حرارتها -80 مئويَّة مدَّة ليلة كاملة أيضاً، لتُحفظَ أخيراً في حافظة النَّتروجين السَّائل في الدرجة -196 مئويَّة. وللتأكُّد من قدرة الخلايا $CD34^+$ على المحافظة على حيويَّتها وعلى قدرتها على التَّجديد الذاتي بعد تجميدها في الشُّروط المذكورة أعلاه، أُزيلَ تجميد الخلايا عدَّة مرَّات وفي فترات زمنيَّة مختلفة وصلت حتَّى 24 شهر. نُقِلت الخلايا سريعاً من حافظة النَّتروجين إلى حَمَّام مائي درجة حرارته 37 مئويَّة حتَّى زوال البُورات الجليديَّة، ثمَّ مُدِّد وسط الخلايا بإضافة 1 ميلي لتر من وسط استنابات IMDM دافئ ومُدعَّم بـ 10% FBS، ثمَّ نُبِدت الخلايا بسرعة 200 xg في الدَّقيقة مدَّة 5 دقائق، وأُهْمِلَ الطَّافي. عُقِّت الخلايا في 3 ميلي لتر من وسط الاستنابات IMDM المُدعَّم بـ 10% FBS، وحُسِبَت النَّسبة المئويَّة للخلايا الحيَّة بتلوينها بصبغة التريبان الأزرق، ثمَّ تمَّ عدُّها باستعمال عدَّادة مالاسيز وفحصها بالمجهر الضوئي. تمَّ التَّأكُّد من محافظة الخلايا بعد تجميدها على حالتها الفتية باختبار قدرتها على التَّجدد بالانقسام والتَّضاعف في وسط الاستنابات StemLine، وبتتميطها بجهاز قياس الجريان الخلوي. استُنْبِتت الخلايا في صفائح الاستنابات الخلوي ذات الست آبار بمعدَّل 5×10^5 خلية/بئر/ 2 ميلي لتر من وسط الاستنابات StemLine المُدعَّم بـ 25% FBS في الحاضنة عند درجة حرارة 37 مئويَّة و5% CO_2 ورطوبة 100%، وتمَّ تبديل وسط الاستنابات بشكل دوري كل ثلاثة أيَّام، وتمَّ المحافظة على الخلايا حتَّى 8 أسبوع. وتمَّ بالمقابل حُضن، الخلايا قبل الاستنابات وبعده، بوجود 20 ميكروتر من الأضداد ضد- $CD34$ المقرونة بـ FITC/ مليون خلية، مدَّة 30 دقيقة في مكان خافت الإضاءة وعلى النَّلج، وغُسِلت الخلايا للتخلُّص من الأضداد غير المرتبطة، ولوُنَّت نواها بصبغة PI تركيزها 50 ميكروغرام/ميلي لتر من الوقاء الملحي الفوسفاتي مدَّة 15 دقيقة في الدَّرجة 4 مئويَّة وفي مكان خافت الإضاءة أيضاً. ثمَّ حُلَّت بجهاز

قياس الجريان الخلوي وتمَّ قبول 10000 حادثة. وتمَّ تحليل نتائج التَّتميط باستعمال برنامج Cell Quest-Pro، وحُسِبَت النسبة المئوية للخلايا $CD34^+$ الحية.

10.3. تقييم شدة الإخماج بطفيلي اللشمانيا *L. Tropica* في الخلايا المتمايزة:

لتحديد أثر الأمصال المستعملة في هذه الدراسة (FBS25%، HS + 12.5% 12.5% FBS، HS25%) على تمايز الخلايا $CD34^+$ وظيفياً من حيث قدرتها على ابتلاع الطفيلي، تمَّ خَمَج الخلايا بطفيلي طور الاستتباب للشمانيا المدارية، وحِساب النسبة المئوية للخلايا المخموجة، وشدة الإخماج.

حيث تمَّ تقدير عدد طفيلي اللشمانيا المدارية المستتبت في مخبر الدراسات العليا في قسم علم الحياة الحيوانية عن طريق تلوين 20 ميكرو لتر من معلق طفيلي اللشمانيا بـ عشرين ميكرو لتر من محلول جيمزا وتركها مدة 15 دقيقة في البراد ثم تمزج جيداً وتفرش تحت صفيحة زجاجية على عدادة النيوباور باستخدام المجهر الضوئي، وتطبيق معادلة حساب العدادة بأخذ كل من عامل التمديد ومعامل الصفيحة بعين الاعتبار. بعد ذلك تمَّ حضن الخلايا المتمايزة مع طفيلي اللشمانيا المدارية وحيد السوط بمعدّل 1:5 (كل خلية : خمس طفيليات لشمانيا) مدّة ساعتين ضمن حاضنة 5% CO_2 عند درجة حرارة 37 مئوية، ثمَّ طُرح الفائض من الطفيليات التي لم تدخل ضمن الخلايا بغسل آبار الزرع عدّة مرّات بمحلول ملحي فوسفاتي PBS، وبعد 24-48 ساعة من الحضن ضمن الحاضنة طُرح السائل الطافي ضمن آبار صفائح الزرع.

ثمَّ نُبِتت ولُوئت الخلايا بصبغة غيمزا كما ذُكر في الفقرة (3-6)، ودُرِست تحت المجهر المقلوب حيث تمَّ تقييم النسبة المئوية للخلايا المخموجة بعد 300 خلية في البئر (مخمجة وغير مخمجة)، وعدّ الأشكال داخلية السوط داخل هذه الخلايا لحساب شدة الخمج عن طريق المعادلة التالية:

$$\text{الشدة الإخماجية} = \text{عدد الأشكال داخلية السوط} / \text{عدد الخلايا المخمجة}.$$

ونمت مقارنة النتائج المشاهدة للخلايا المضاف لها عوامل النمو والتمايز مع الشاهد السلبي للخلايا غير المضاف لها أي من الأمصال أو عوامل النمو والتمايز. كما تم أيضاً دراسة أثر طريقة العزل على تقييم نسبة الخلايا المخمجة وشدة الإخماج.

11.3. قياس شدة الأكسدة ضمن الجسيمات الحالة في الخلايا المتميزة:

بعد أن تقوم الخلايا البالعة Phagocytic cells ببلعمة البكتريا وتصبح البكتريا ضمن جسيمات البلعمة Phagosomes فإنها تنتج وسائط استقلاب (أيض) Metabolites تتفاعل مع الأوكسجين تقوم بقتل البكتريا. ويمكن الكشف عن تكوّن مواد الأكسدة هذه بتقنية قياس الجريان الخلوي، باستعمال مسبر قابل للتفلور يمثل ماداً لهذه المواد المؤكسدة. أحد هذه المسابر هو الدهيدروورودامين-123 غير المنقول (DHR-123) والذي عند تأكسده يتحوّل إلى رودامين-123 (R-123) ويُصدر تفلوراً بلون أخضر.

إنّ متوسط شدة التفلور للرودامين-123 تعكس شدة النشاط الأنزيمي ودرجة الأكسدة على مستوى الخلية، ومن خلال شدة التفلور يمكن حساب نسبة الخلايا البالعة القادرة على قتل البكتريا.

وفي هذه الدراسة تمت إثارة الخلايا المتميزة لتنتج المواد المؤكسدة في الوسط الصنعي بحضن هذه الخلايا مع البكتريا ومع أحد المحرّضات الفزيولوجية. باستعمال طاقم العتيدة (BURSTTEST kit, Germany). حيث أنّ هذه المحرّضات لعبت دوراً في تحويل الدهيدروورودامين-123 الذي لعب دور ماد قابل للتألق عند حدوث نشاط أنزيمي ضمن الجسيمات الحالة في البالعة وحولته إلى الرودامين ذي التألق الأخضر. وذلك بتحفيز $10^6 \times 1$ خلية حُصِنَت مدّة 60 دقيقة ضمن حمام مائي عند درجة حرارة 37 مئوية مع بكتريا *E. coli* غير الموسومة المغلقة منعياً، بمعدّل $10^6 \times 20$ في الملي لتر، والمحرّض الفزيولوجي القوي Protein kinase C ligand phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)، أو الببتيد الصناعي Lue -Phe -Met Formyl-N The Chemotactic Peptide (FMLP). كل منها في أنبوب اختبار مستقل مدّة 3 ساعة، مع الأخذ بعين الاعتبار الشاهد السلبي غير المحرّض (خلايا متميزة في دائرة ملحية فوسفاتية فقط). غُسِلَت بعدها الخلايا بالنّبد ضمن 3 ملي لتر دائرة ملحية فوسفاتية مدّة خمس دقائق عند السرعة 250 gx درجة حرارة 4 مئوية. بعدها مرّرت العينات على جهاز قياس الجريان الخلوي

خلال ساعة على الأكثر، وكان التَّبويب مباشراً على المجموعة (إعداد العتبة على أساس إشارة FL2 للتَّخُلص من إشارة البكتريا). بحيث سَجَلت البيانات (10,000 -15,000) خلية.

3-12. الدَّراسة الإحصائيَّة

أُجريت جميع التَّجارب باستعمال عدَّة مُكرَّرات لكلِّ شَرطٍ تجريبيٍّ ضمن التَّجربة الواحدة وذلك في ثلاث تجارب كاملة مكررة، وطُبِّقَ برنامج SPSS النسخة 19 (SPSS statical package, version 19 for windows) لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها ورسم المنحنيات البيانيَّة.

اعتمدَ اختبار مقارنة المتوسَّطات Independent Sample Student t- test لدراسة أثر طريقة انتقاء الخلايا CD34+ على عدد الخلايا المعزولة، نقاوتها، حيويَّتها، وسرعة تمايزها تجاه بالعات كبيرة، وأثر معالجة الخلايا المستنبتة بالأمصال المختلفة (HS 25%- FBS 25%- HS 12.5%+FBS 12.5%) على عدد الخلايا الكلِّي، والتَّعبير عن مستضدَّات الخلايا الجذعيَّة ومستضدَّات التَّمايز، وأثر الإنترلوكين-6 على عدد الخلايا الكلِّي وكذلك التَّعبير عن مستضدَّات التَّمايز (التمايز البنيوي)، وأثر طريقة العزل على شدَّة الإخماج وشدَّة الأكسدة ضمن الجسيمات الحالة وكذلك تحديد الوسط الأنسب لتمايز الخلايا. واعتبرت القيمة $p > 0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً عند مسوى النقَّة 95%. كما تمَّ الاستعانة ببرنامج الإكسل (Excel software, Office Microsoft 2010) لرسم البيانات الخطيَّة وتحليل النَّتائج.

النتائج

RESULTS

4.النتائج Results

1-4 . عينات دم الحبل السري البشري وعزل الخلايا الجذعية المولدة للدم CD34+

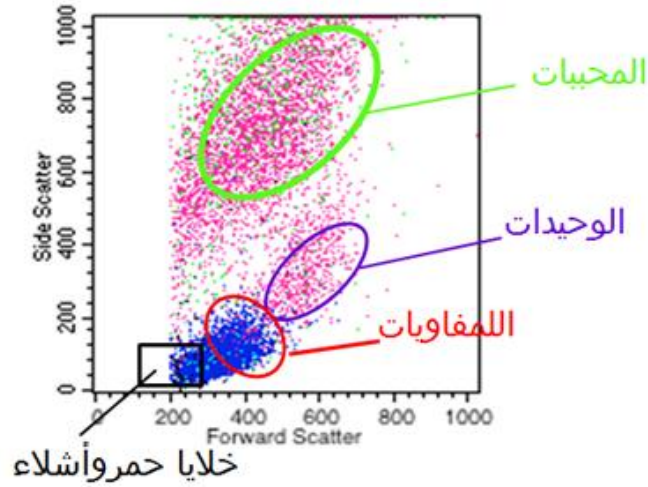
1-1-4. عزل الخلايا وحيدة النواة MNCs

بلغ عدد عينات هذه الدراسة 35 عينة وكان متوسط حجم الدم المسحوبة من وريد الحبل السري (33.13 ± 92.71) ميلي لتر)، وتمَّ تحويل عينات الدم إلى غلابة بيضاء، فُصِّلت بعدها الخلايا وحيدة النواة بالنبذ على وسط الفيكول (الشكل 1-4). وبلغ متوسط العدد الكلي للخلايا وحيدة النواة (200×10^6) خلية) والذي قُدِّرَ بواسطة عدادة المالايسيز، وكانت حيويتها عالية $(98.60 \pm 15.20\%)$ حيث قُدِّرَت هذه الحيوية بالتلوين بصبغة التريبيان الأزرق.



الشكل 1-4: صورة تظهر الطبقة المُكوَّنة من الخلايا وحيدة النواة MNCs، المعزولة بنبذ الغلابة البيضاء على وسط الفيكول؛ حيث تتوضع هذه الطبقة بين طبقة بلازما الدم وطبقة وسط الفيكول، بينما تترسب خلايا الدم الحمراء في قعر أنبوب النبذ.

كما تمَّ تحليل المكونات الخلوية لطبقة الخلايا وحيدة النواة بجهاز قياس الجريان الخلوي. وتمَّ التعرف على الأنماط الخلوية المختلفة المكونة لدم الحبل السري، ومكان توضعها على محوري التبعثر الأمامي FSC والجانبية SSC، والتي تفيد لاحقاً في: تحديد مكان توضع الخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$ ، ومتابعة مراحل عزل وتنقية هذه الخلايا (الشكل 2-4).



الشكل 4-2: تمثيل بياني نقطي للمكونات الخلوية لطبقة الخلايا وحيدة النواة، تُبين الأنماط الخلوية المختلفة المكونة لدم الحبل السري ومكان توضعها على محوري التبعثر الأمامي FSC (الحجم) والتبعثر الجانبي SSC (التحلب).

استُعملت هذه المكونات الخلوية لاحقاً، لعزل الخلايا الجذعية المُولدة للدم $CD34^+$ بطريقة العزل المناعي المغناطيسي الإيجابي أو السلبي.

4-2. تقييم كمي وكيفي للخلايا الجذعية $CD34^+$ المعزولة

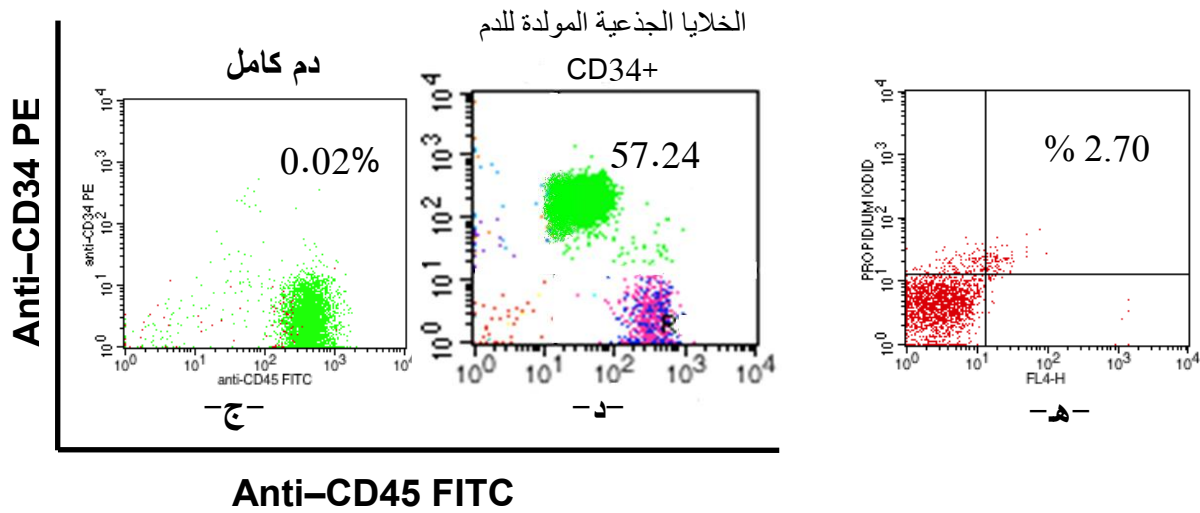
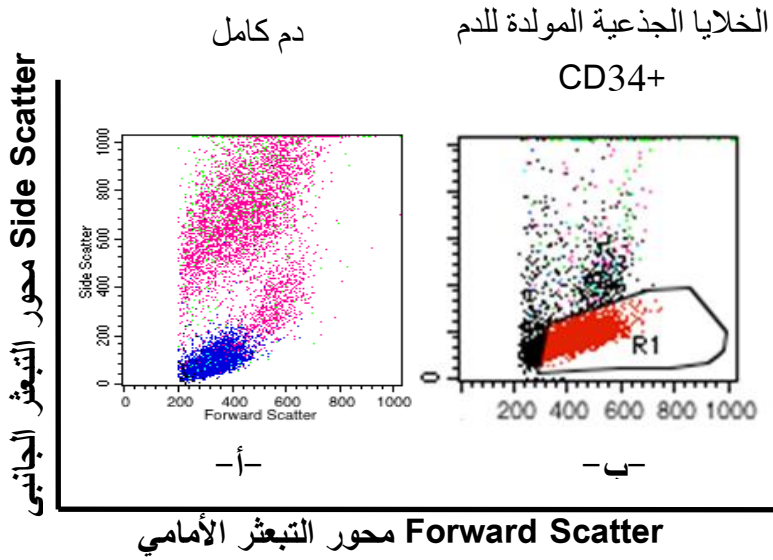
تمَّ عزل الخلايا الجذعية المُولدة للدم $CD34^+$ بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي أو السلبي، وذلك لتحديد الطريقة الأفضل التي تمكننا من الحصول على السلائف الأقل نضجاً وبنقاوة عالية تفيد في مراحل البحث اللاحقة من تكثير لهذه الخلايا وتحريض لتمايزها.

وفي كل طريقة تم انتقاء ثلاث عينات عشوائياً تماثلت من حيث شروط العزل. وللتحقق من فعالية الطريقة المتبعة في تنقية الخلايا الجذعية المُولدة للدم $CD34^+$ ، مرَّرت الخلايا الناتجة عن الانتقاء المناعي المغناطيسي على جهاز قياس الجريان الخلوي Flowcytometry، وتمَّ تحليل النمط المناعي Immunophenotypical لهذه الخلايا، وقُدِّر المتوسط الحسابي لكلٍ من العدد الكلي للخلايا الجذعية المُولدة للدم $CD34^+$ المنتقاة من الخلايا وحيدة النواة ($CD34^+/MNCs$)، ونسبها المئوية، والنسبة المئوية لحيوية هذه الخلايا (Viability)، ودرجة نقاوتها (Purity) وذلك خلال مراحل العزل المتتالية. كما ساعد الشكل النموذجي لمرتمس خلايا دم الحبل السري البشري الكامل في متابعة مراحل إغناء الخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$ الشكل (4-2)، وأكَّد نجاح الطرائق المتبعة في تنقية الخلايا $CD34$.

1-2-4. الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34⁺

عُزِلَت الخلايا الجذعية المولدة للدم CD34⁺، في التجارب المخبرية الأولى، وفقاً للتوصيات المذكورة في عتيدة Kit الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي. وتضمّنت هذه الطريقة ثلاث مراحل؛ تم في المرحلة الأولى إغناء العينات بالخلايا CD34⁺، عبر التخلص من خلايا الدم الحمراء ومن الخلايا غير المرغوب بعزلها والتي لا تحمل الواسمة النوعية للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34، ثم فُصِلَت الخلايا وحيدة النواة بالنبذ على وسط الفيكول، وتُبِعَت بالعزل المناعي المغناطيسي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34⁺. جُمِعَت الخلايا من الشدفة المرتبطة إلى جدار العمود، بينما أُهْمِلَ المعلق الخلوي، وتمّ تقدير عدد الخلايا المعزولة باستعمال عدادة الملايسيز؛ فبلغ متوسط عددها الكلي ($10 \times 4^6 \pm 10 \times 6^5$ خلية/ميلي لتر).

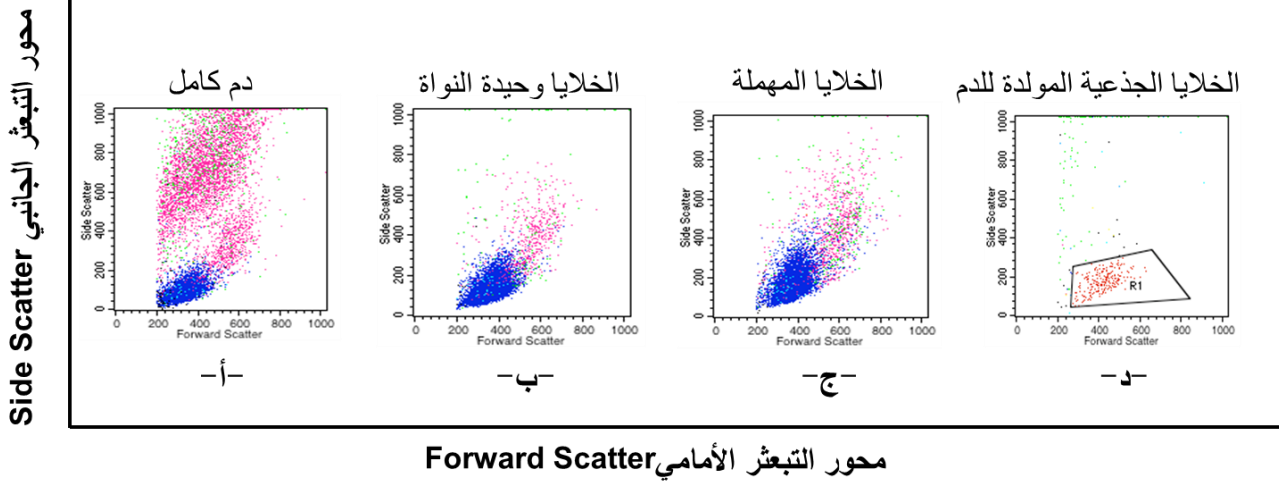
استعملت تقنية قياس الجريان الخلوي لتنميط الخلايا المعزولة وتقدير حيويتها بعد تلوينها بصبغة البروبيديوم أيودايد PI النوعي للحمض الريبي النووي DNA والذي ينفذ عبر الأغشية الخلوية للخلايا الميتة، وبيّنت نتائجنا أنه تمّ بطريقة العزل المناعي المغناطيسي الإيجابي المحافظة على حيوية الخلايا (0.50 ± 97.30 %)؛ فلم تتجاوز نسبة الخلايا الميتة (2.70 %) ($3-4$: ه). وتم إغناء العينات بالخلايا CD34⁺؛ حيث بلغت النسبة المئوية للخلايا CD34⁺ في دم الحبل السري 0.02 %، وتطبيق طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي، ارتفعت النسبة المئوية لهذه الخلايا لتصل إلى حوالي 57 %. ولدى تحديد النسب المئوية للجهمرتين الخلويتين CD34⁺CD45⁺ و CD34⁻CD45⁺، تبين الحصول على نسب مئوية بلغت 19.23 ± 57.24 (%) و 6.34 ± 33.89 (%، على التوالي، وبنقاوة قُدِرَت بـ 8.78 ± 54.33 %). إلا أنّ النتائج بينت انخفاض المردود الخلوي لخلايا النمط CD34⁺CD45⁺ وانخفاض نقاوتها، الشكل ($3-4$: أ، ب، ج، د)، لذلك تم إجراء بعض التعديلات على طريقة الإنتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي بغية تحسين المردود الخلوي ونقاوة الخلايا الجذعية CD34⁺.



الشكل 3-4: تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS و SSC يمثل فيها التوبوب R1 جمهرة الخلايا $CD34^+CD45^+$ المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي، وتشير هذه التمثيلات إلى الإغناء بالخلايا الجذعية المولدة للدم $CD34^+$. وتمثيل بياني نقطي يبين النسبة المئوية للخلايا $CD34^+$ الميتة باستعمال الصباغ PI المتفلور (ه).

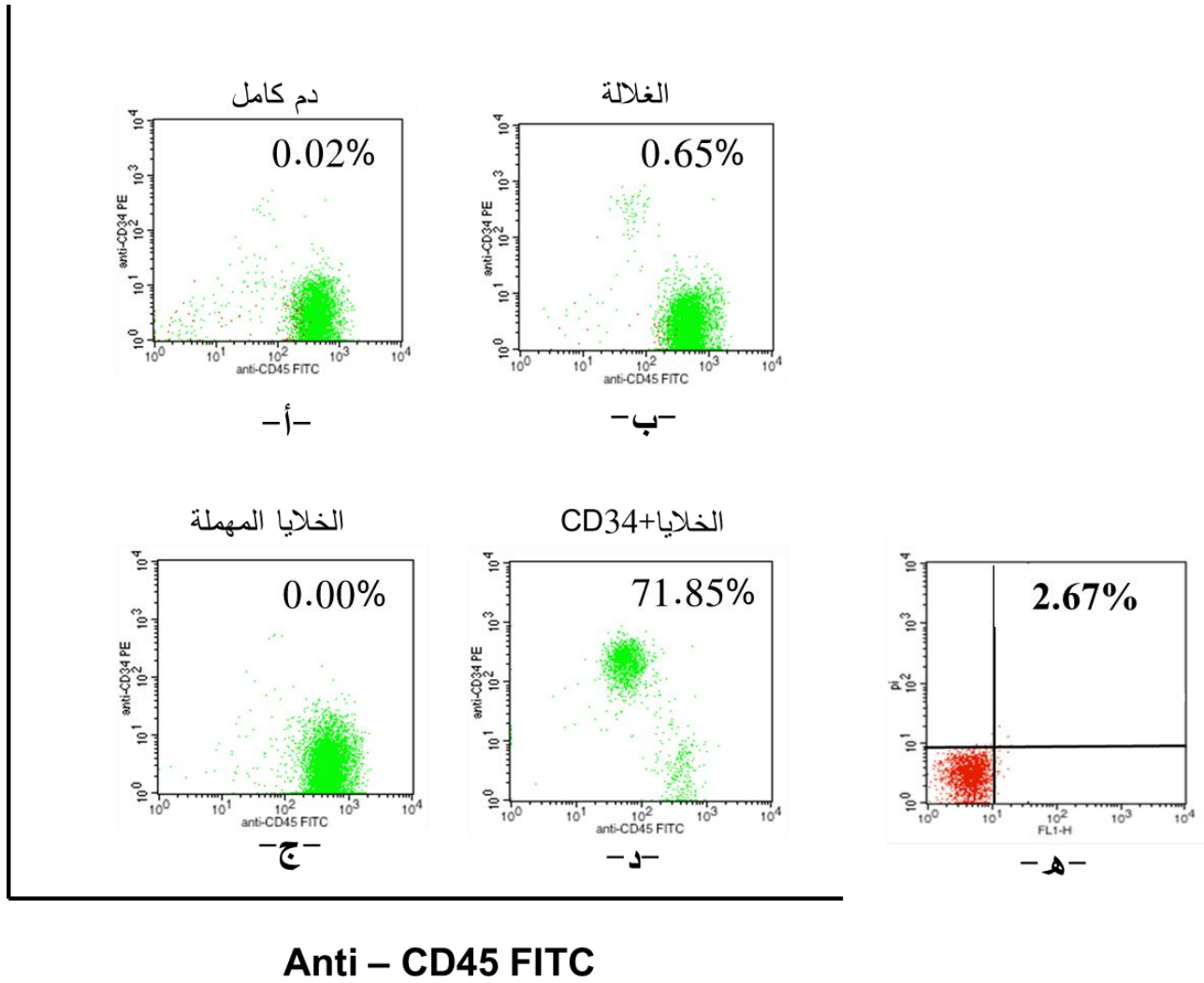
وتضمنت التعديلات التي أجريت على طريقة العزل المناعي المغناطيسي، تطبيق طريقة للعزل تتضمن مراحل العزل التقليدية المتبعة في الدراسات المختلفة مجتمعة لتشمل: تحويل العينة إلى غلالة بيضاء ومن ثم فصل وحيدات النوى بالنبذ على الفيكول، ثم إغناء العينة بالخلايا $CD34^+$ باستعمال عتيدة الانتقاء الإيجابي، يليها العزل المناعي المغناطيسي لهذه الخلايا الذي تمت فيه زيادة في عدد مرات الغسل لتنقية الخلايا. نُمطت هذه الخلايا المعزولة بتقنية الجريان الخلوي خلال مراحل العزل المختلفة (دم حبل سري، الخلايا المنواة بعد الإغناء الأولي والنبذ على الفيكول، المعلق الخلوي المهمل بعد التمرير على عمود المغناطيس، الخلايا المنواة المنتقاة بالمغناطيس)، وبينت النتائج أنه تمّ

التخلص من العديد من الأنماط الخلوية التي لا تعبر عن المستضد الغشائي CD34، ومن الأشلاء الخلوية، الشكل (4-4، أ، ب، ج، د).



الشكل 4-4: تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS و SSC تبين الإغناء بالخلايا الجذعية المؤددة للدم CD34⁺ خلال مراحل مختلفة من عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الايجابي المعدل: أ؛ دم الحبل السري. ب؛ الخلايا وحيدة النواة بعد الإغناء الأولي والفصل على الفيكول. ج: المعلق الخلوي المهمل بعد العزل المناعي المغناطيسي. د؛ الخلايا CD34⁺ المعزولة مغناطيسياً؛ حيث يمثل فيها التوبوب R1 جمهرة الخلايا CD34⁺CD45⁺.

وبالتحليل الكمي للخلايا الجذعية CD34⁺ خلال مراحل العزل المختلفة بينت النتائج فعالية التعديلات التي أجريت على طريقة الانتقاء المناعي الإيجابي؛ حيث تم التخلص من نسبة كبيرة من الخلايا التي لا تحمل الواسمة CD34. بلغت النسبة المئوية للخلايا CD34⁺ في دم الحبل السري 0.02 %، وارتفع مردود هذه الخلايا لدى تحويل عينات الدم إلى غلالة بيضاء إلى 0.65 %، ووصل المردود الخلوي للخلايا CD34⁺ المعزولة إلى 71.85 % (الشكل 4-5، أ، ب، ج، د)، وبنقاوة بلغت 1.22±82.58 %. كما استعملت صبغة البروبيديوم أيودايد PI، وتبين أن نسبة الخلايا الميتة (2.67 %)، وهذا يشير إلى حيوية بلغت (0.50±97.33 %) (الشكل 4-5، هـ).



الشكل 4-5: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34+ خلال مراحل العزل المختلفة الآتية: أ؛ دم حبل سري كامل ب؛ الخلايا وحيدة النواة MNCS بعد تحويل العينة إلى غلالة متبوعة بالإغناء الأولي والفصل على وسط الفيكول. ج؛ المعلق الخلوي المهمل بعد العزل المناعي المغناطيسي. د؛ الخلايا الجذعية المؤددة للدم CD34+ المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي المعدلة. ه؛ تمثيل بياني نقطي يبين النسبة المئوية للخلايا CD34+ الميتة باستعمال الصباغ PI المنقولور. وتشير هذه المخططات إلى زيادة نقاوة العزل بالطريقة المعدلة بالمقارنة مع الطريقة التقليدية

وبين الجدول (1-4) أهمية التعديلات التي أجريت على طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا CD34+ وخاصة في ما يتعلق بنقاوة هذه الخلايا وبفارق إحصائي معنوي ($p > 0.006$)؛ حيث عُزلت هذه الخلايا بنقاوة تقدر بـ (1.22 ± 82.58 %) في الطريقة المعدلة و(8.78 ± 54.33 %) في الطريقة التقليدية. وبلغت النسبة المئوية لخلايا النمط CD34+CD45+ (6.66 ± 71.85 %)، وزادت بذلك على المرود الخلوي الذي حصلنا عليه بتطبيق الطريقة التقليدية (19.2 ± 57.24 %)، ولكن ترافق ذلك مع انخفاض في نسبة خلايا النمط CD34-CD45+ والتي بلغت (1.79 ± 22.9 % و 6.43 ± 33.89 % في كل من الطريقة المعدلة والتقليدية، على التوالي). مع ذلك،

يبقى المجموع الكلي لهذين النمطين الخلويين متقارباً لدى تطبيق كل من الطريقة المعدلة أو التقليدية؛ حيث بلغت النسبة المئوية للخلايا $CD34^+$ حوالي 95% و 91%، على التوالي. هذا ولم تؤثر طريقة العزل في حيوية الخلايا؛ فتميزت هذه الخلايا في كلتا الطريقتين بحيوية مرتفعة، فُدرت بجهاز الجريان الخلوي وباستعمال صباغ البروبيديوم أيودايد PI، فبلغت حوالي 97% في كليهما.

الجدول 4-1: مقارنة نتائج الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم $CD34^+$ بين الطريقة التقليدية والطريقة المعدلة.

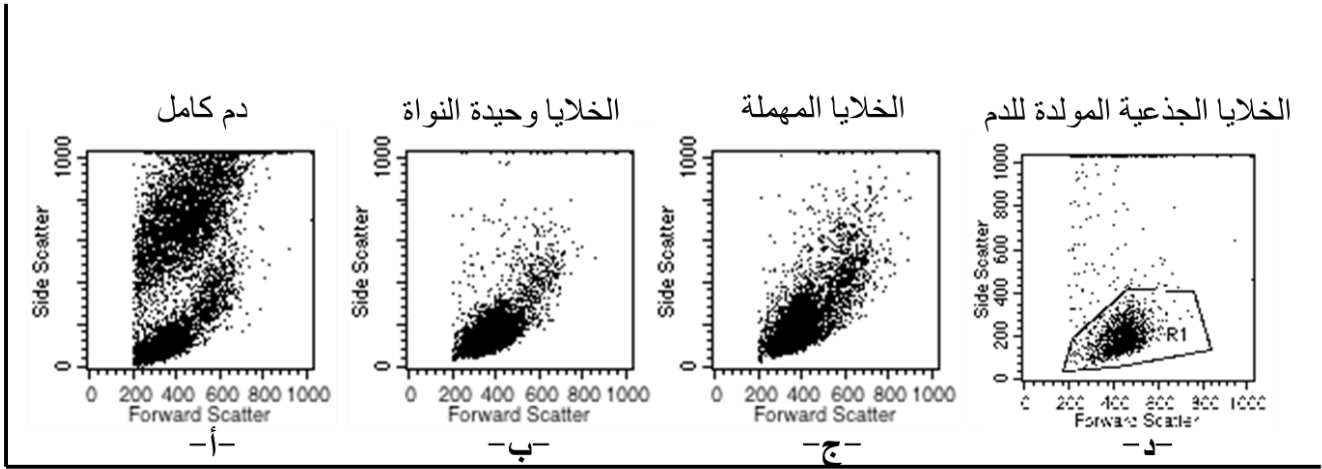
المتغيرات	الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي قبل التعديل	الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي بعد التعديل	P= 0.05
عدد الخلايا وحيدة النواة MNCS	$4 \times 10^6 \pm 6 \times 10^5$ خلية	$2 \times 10^6 \pm 1.32 \times 10^6$ خلية	p < 0.11
نسبة الخلايا $CD34^+ CD45^+$	57.24 ± 19.2%	71.85 ± 6.66%	p < 0.28
نقاوة العزل	54.33 ± 8.78%	82.58 ± 1.22%	p > 0.006
نسبة الخلايا الحية	97.30 ± 0.50%	97.33 ± 0.5%	p < 0.80
نسبة الخلايا $CD34^- CD45^+$	33.89 ± 6.43%	22.90 ± 1.79%	p > 0.04

بالنتيجة، رغم تميُّز الطريقة المعدلة في الحصول على نسبة مئوية مرتفعة من خلايا النمط $CD34^+ CD45^+$ (6.66 ± 71.85%)، وبنقاوة عالية (1.22 ± 82.58%)، إلا أنه لوحظ تراجعاً بشكل عام في عدد الخلايا $CD34^+$ المنتقاة بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي المعدلة ($2 \times 10^6 \pm 1.32 \times 10^6$ خلية) بالمقارنة مع قبل التعديل ($4 \times 10^6 \pm 6 \times 10^5$ خلية)، لذلك تم تطبيق طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي لزيادة المردود الخلوي وربما نقاوة الخلايا $CD34^+$.

4-2-2. الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي

تمّ في هذه الدراسة تطبيق التوصيات المرفقة مع عتيدة الإنتقاء السلبي للخلايا الجذعية المؤلّدة للدم $CD34^+$ وسليقاتها من عينات دم الحبل السري البشري. وتضمنت هذه الطريقة ثلاث مراحل؛ تم في المرحلة الأولى فصل الخلايا وحيدة النواة بالنبذ على الفيكول. وتم، في المرحلة الثانية، التخلص من الخلايا التي لا تحمل الواسمة $CD34$ (اللمفاويات التائية، واللمفاويات البائية، وخلايا القتل الطبيعيون NK، والخلايا وحيدة النواة، والخلايا كبيرة النواة، والعدلات، والولوعات بالإيزين، وخلايا الدم الحمراء، والصفائح الدموية) وذلك بحضن خلايا الدم مع أضداد نوعية لواسمات هذه الخلايا. وأخيراً، عُرِلت الخلايا الجذعية المؤلّدة للدم $CD34^+$ من السائل الطافي بينما ارتبطت الخلايا التي لا تحمل الواسمة $CD34$ إلى جدار العمود لدى وضعه داخل المغناطيس المخصص للفصل المناعي المغناطيسي.

محور التبعثر الجانبي Side Scatter

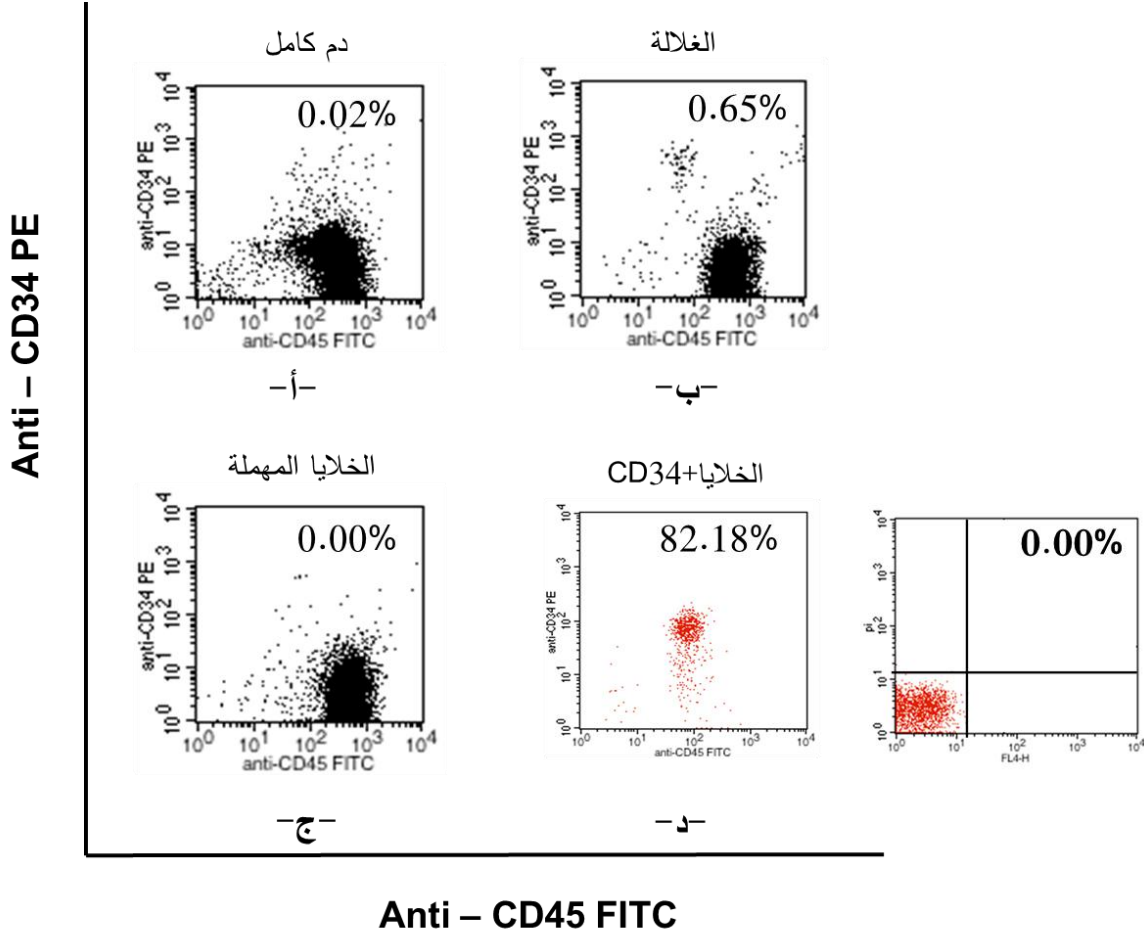


محور التبعثر الأمامي Forward Scatter

الشكل 4-6: تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS و SSC تبين الإغناء بالخلايا الجذعية المؤلّدة للدم $CD34^+$ خلال مراحل المختلفة من عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي: أ؛ دم الحبل السري. ب؛ الخلايا وحيدة النواة بعد الإغناء الأولي والفصل على الفيكول. ج؛ الخلايا المهملة بعد العزل المناعي المغناطيسي. د؛ الخلايا $CD34^+$ المعزولة مغناطيسياً؛ حيث يمثل فيها التوبوب R1 جمهرة الخلايا $CD34^+CD45^+$.

وبالتحليل الكمي للخلايا الجذعية $CD34^+$ خلال مراحل العزل المختلفة بينت النتائج فعالية طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي في التخلص من نسبة كبيرة من الخلايا التي لا تحمل الواسمة $CD34$ ؛ حيث بلغت النسبة المئوية للخلايا $CD34^+$ في دم الحبل السري 0.02 %، وارتفع مردود هذه الخلايا لدى تحويل عينات الدم إلى غلالة بيضاء إلى 0.65 %، ووصل المردود الخلوي للخلايا $CD34^+$ المعزولة إلى 82.18 % (الشكل 4-6، أ، ب، ج، د)،

وبنقاوة بلغت 95.53 %، وحيوية قُدرت بتلون الخلايا بصبغة البروبيديوم أيودايد PI وتحليلها باستعمال جهاز الجريان الخلوي، فبلغت بـ 100 %، (الشكل 4-7، ه).



الشكل 4-7: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34⁺ خلال مراحل العزل المختلفة الآتية:

أ؛ دم حبل سري كامل. ب؛ الخلايا وحيدة النواة MNCs بعد تحويل العينة إلى غلالة متبوعة بالإغناء الأولي والفصل على وسط الفيكول. ج؛ المعلق الخلوي المهمل بعد العزل المناعي المغناطيسي. د؛ الخلايا الجذعية المؤددة للدم CD34⁺ المعزولة بالانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي. ه؛ تمثيل بياني نقطي يبين النسبة المئوية للخلايا CD34⁺ المينة باستعمال الصباغ PI المتفلور

ولدى مقارنة هذه النتائج بنتائج طريقة العزل المناعي المغناطيسي الايجابي المعدلة (الجدول 4-2)، تبين أنه وبالرغم من انخفاض المردود الخلوي للخلايا وحيدة النواة في طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي ($10^5 \times 7 \pm 2.8 \times 10^5$ خلية) بالمقارنة مع الطريقة الإيجابية المعدلة ($2 \times 10^6 \pm 1.32 \times 10^6$ خلية)، تفوقت هذه الطريقة على طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي المعدلة في ما يتعلق بالنسبة المئوية لخلايا النمط CD34⁺CD45⁺ (82.18±2.25%) بالمقارنة مع ما تم الحصول عليه في طريقة الانتقاء الإيجابي المعدلة (71.85±6.66%)،

وبفارق إحصائي معنوي $p > 0.05$. وترافق ذلك مع تراجع في النسبة المئوية لخلايا النمط $CD34^+CD45^+$ ؛ حيث بلغت (1.34 ± 15.64 %) في طريقة العزل السلبي و(1.79 ± 22.90 %) في طريقة العزل الإيجابي. ولكن تميزت الخلايا التي تحمل الواسمة $CD34$ المعزولة بطريقة الانتقاء السلبي بنقاوة مرتفعة جداً (0.41 ± 97.86 %) بالمقارنة مع طريقة الانتقاء الإيجابي التقليدية (8.78 ± 54.33 %) أو حتى المعدلة منها (1.22 ± 82.58 %). كما تميزت بالمحافظة وبشكل كامل على حيوية الخلايا؛ فكانت جميع الخلايا $CD34^+$ المعزولة حية (الجدول 4-2).

الجدول 4-2: مقارنة نتائج الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي للخلايا الجذعية المؤددة للدم $CD34^+$ في الطريقة المعدلة بنتائج الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي.

المتغيرات	الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي بعد التعديل	الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي	P= 0.05
عدد الخلايا وحيدة النواة MNCS	$2 \pm 1.32 \times 10^6$ خلية	$7 \times 10^5 \pm 2.8 \times 10^5$ خلية	P > 0.02
نسبة الخلايا $CD34^+CD45^+$	71.85 ± 6.66 %	82.18 ± 2.25 %	P < 0.16
نقاوة العزل	82.58 ± 1.22 %	97.86 ± 0.41 %	P > 0.004
نسبة الخلايا الحية	97.33 ± 0.5 %	100 %	P > 0.01
نسبة الخلايا $CD34^-CD45^+$	22.90 ± 1.79 %	15.64 ± 1.34 %	P > 0.00

أشارت نتائج هذه الدراسة إلى أهمية تطبيق طريقة العزل المناعي المغناطيسي السلبي للحصول على مردود من الخلايا $CD34^+CD45^+$ ، وبنقاوة مرتفعة جداً، مع المحافظة على حيوية هذه الخلايا والتي يمكن أن تستعمل في مراحل لاحقة لتكثيرها أو تحريض تمايزها أو حتى في التطبيقات السريرية للخلايا الجذعية المولدة للدم.

3-4. تنميط الخلايا الجذعية مناعياً بتقنية قياس التدفق الخلوي

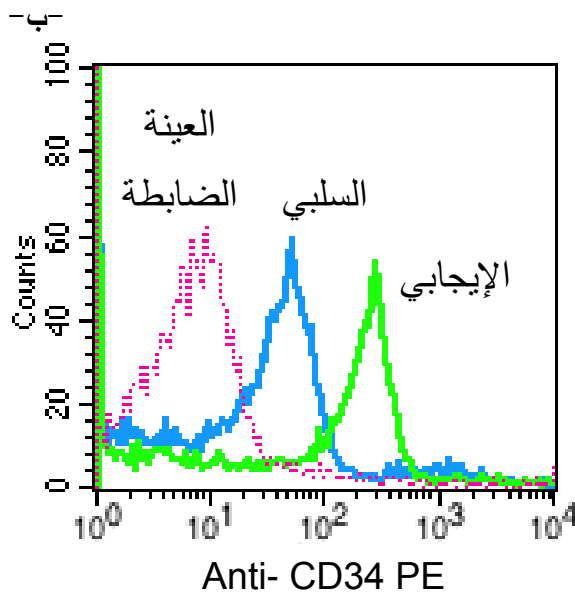
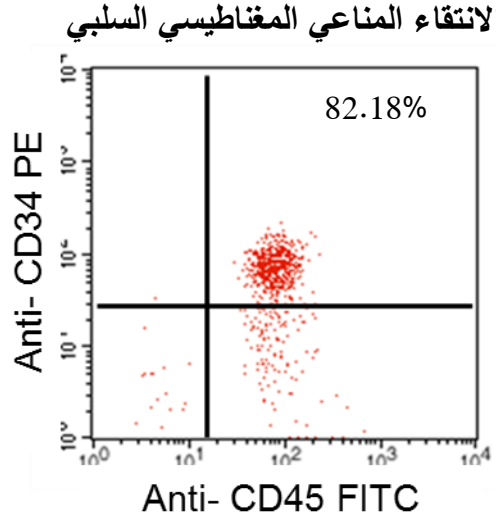
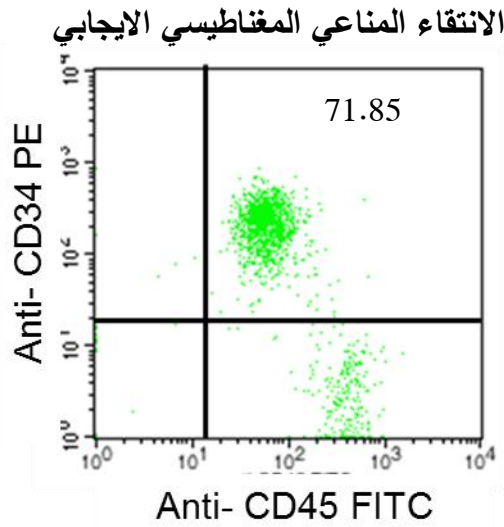
إنَّ التنميط المناعي للخلايا الجذعية باستعمال كلا المستضدين $CD34^+$ و $CD45^+$ بالإضافة إلى المستضدات الأخرى سمح بمتابعة التعبير عن المستضدات التي ميزت تحت الجمهرات الخلوية subpopulations

المختلفة والسلائف المبكرة التي غاب فيها التعبير عن المستضد CD38 والمستضد HLA-DR، والطلائع المفعلة التي عبرت عن CD38، والطلائع النقية CD33⁺، والخلايا المبكرة التي عبرت عن مستقبل عامل الخلايا الجذعية CD117، ومستقبل (الإنترلوكين-3) CD123 المسؤول عن الانقسام في الخلايا الجذعية، ومستقبل العامل CD105 (TGF-β) الهام في سيرورة تمايز الخلايا المولدة للدم وحيويتها. حيث استعمل طاقم من الأضداد وحيدة النسيلة النوعية لهذه المستضدات، وحُدّد النمط المناعي للخلايا CD34⁺ ونسبها المئوية، وأخذ بعين الاعتبار أثر طريقة العزل المطبقة وانعكاسها على الطابع المناعي للخلايا المعزولة بكلتا طريقتي الانتقاء المناعي الإيجابي والانتقاء المناعي السلبّي.

دُرِسَ بدايةً التّعبير المترافق لكلّ من الواسمتين CD34 وCD45 على سطوح الخلايا خلال المراحل المختلفة من العزل (دم حبل سري، الخلايا المنواة بعد النّبذ على الفيكول، الخلايا المهملة بعد العزل المغناطيسي، الخلايا المنقّاة بعد العزل المغناطيسي)، وبينت النتائج ارتفاع النّسبة المئويّة للخلايا التي تزامن فيها التعبير عن هاتين الواسمتين (بدون فرق إحصائي $P > 0.05$) في كلتا طريقتي الانتقاء السلبّي والإيجابي. وتفوقت طريقة الانتقاء السلبّي على الإيجابي المعدلة في الحصول على نسبة مرتفعة من هذه الخلايا (2.25±82.18%، و 6.66±71.85%، على التوالي). بينما انخفضت نسبة الخلايا التي تعبر عن المستضد CD45 والتي يغيب فيها التعبير عن المستضد CD34 (CD34⁻CD45⁺؛ 1.34±15.64%) بتطبيق طريقة الانتقاء السلبّي، مقارنة مع الانتقاء الإيجابي بعد التعديل (1.79±22.92%)، (الشكل 4-8، أ و ب).

وأكد الانزياح في مخطط الهستوغرام الذي حققه مرسم الخلايا الجذعية المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبّي التي عبرت عن المستضد CD34⁺ بصورة أقل عن الخلايا الجذعية المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي الإيجابي (الشكل 4-8، ج)، وتفوقت طريقة الانتقاء السلبّي على الإيجابي في الحصول على نسبة مرتفعة من السلائف المبكرة للخلايا الجذعية (CD34⁺CD45⁺) (الشكل 4-8، ج).

ودعا إلى أنّ الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي السلبّي هي خلايا أكثر بدئية وغير مفعّلة بالإضافة إلى أنّ نقاوتها أعلى فقد بلغت نسبة الخلايا التي عبرت عن المستضد CD45 وغاب فيها التعبير عن المستضد CD34 (بقايا خلايا غير مرغوب بها) (1.34±15.64%) بعد الانتقاء السلبّي، و(1.79±22.90%) بعد الانتقاء الإيجابي.

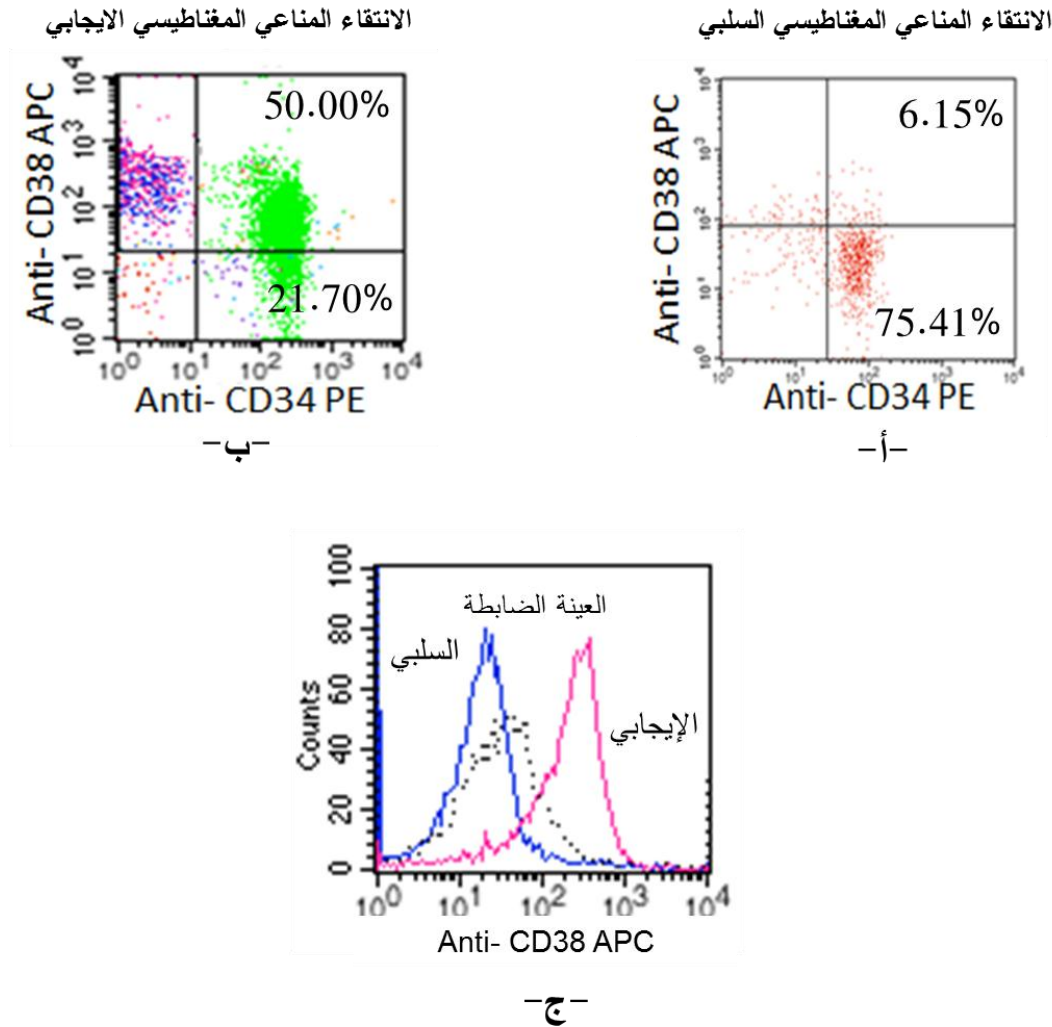


-ج-

الشكل 4-8: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية $CD34^+CD45^+$ بعد عزلها بإحدى طريقتي الانتقاء المناعي الإيجابي المعدلة (أ) أو الانتقاء المناعي السلبي (ب). مخطط هستوغرافي لمرتسم الخلايا التي تعبر عن المستضد السطحي CD34 يوضح الفرق في عدد الخلايا CD34 المعزولة وفي درجة تعبيرها عن المستضد CD45 وذلك باختلاف طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي (ج).

كما تمَّ النَّحْرِي عن الخلايا $CD34^+$ السَّليفة الأُوْلِيَّة Progenitors التي تتَمَثَّل بغياب المستضد CD38 ($CD34^+CD38^-$)، وكانت نسبتها المئويَّة (2.84±21.70%) في الطَّرِيقَة الإِيجابِيَّة (الشكل 4-9، ب) في حين أنَّها ارتفعت إلى (1.39±75.41%) في الطَّرِيقَة السَّليبيَّة (الشكل 4-9، أ)، وبفرق معنوي $p > 0.05$ ، وهذه القيمة

العالية أشارت إلى أن طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السّليبي مفيدة في عزل الخلايا الجذعية الأكثر بدئية والهامة في استنبات الخلايا الجذعية المؤلدة للدم، وذات أهمية خاصة في الزراعات طويلة الأمد.



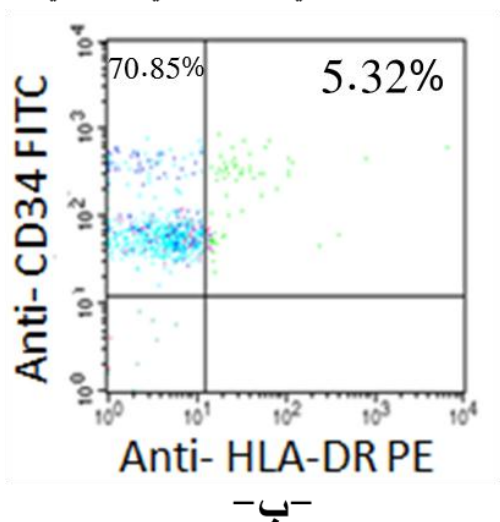
الشكل 4-9: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة

CD38 (CD34⁺CD38⁺) وللخلايا التي تعبر عن الواسمة CD34 ويغيب فيها التعبير عن الواسمة CD38 (CD34⁺CD38⁻)، وذلك بعد عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي (أ) أو الايجابي المعدلة (ب). ج، مخطط هستوغرام يوضح عدد الخلايا CD34⁺، والاختلاف في مستوى تعبيرها عن المستضد CD38، وذلك حسب طريقة الانتقاء. ويبدو واضحاً التراجع في التعبير عن الواسمة CD38 على سطوح الخلايا CD34⁺ المعزولة بالطريقة السلبية بالمقارنة مع هذه الخلايا معزولة بالطريقة الإيجابية المعدلة.

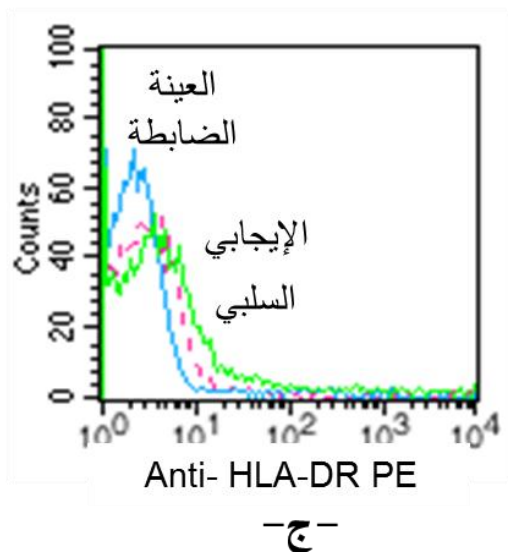
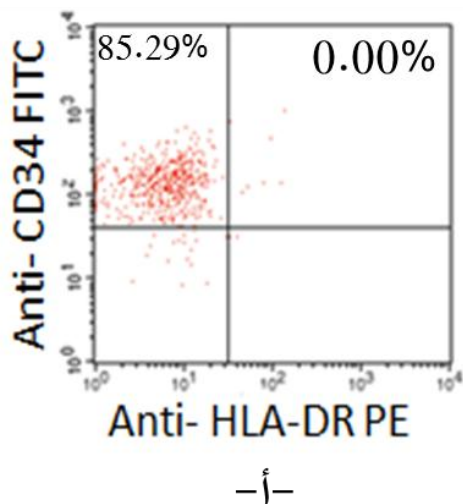
كما أبدت الخلايا الجذعية CD34⁺ المعزولة في هذه الدراسة بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي تعبيراً منخفضاً عن المستضد HLA-DR، حيث لم تتجاوز النسبة المئوية لنمط الخوي CD34⁺HLA-DR⁺ (0.20 ± 5.32%)، بينما بلغت النسبة المئوية للنمط الخوي

الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي، وبلغت النسبة المئوية للنمط الخلوي $CD34^+HLA-DR^-$ (الشكل 4-10، ب). في حين أن المستضد HLA-DR غاب تماماً في $CD34^+HLA-DR^-$ (الشكل 4-10، أ)، بفرق معنوي $p > 0.05$.

الانتقاء المناعي المغناطيسي الايجابي



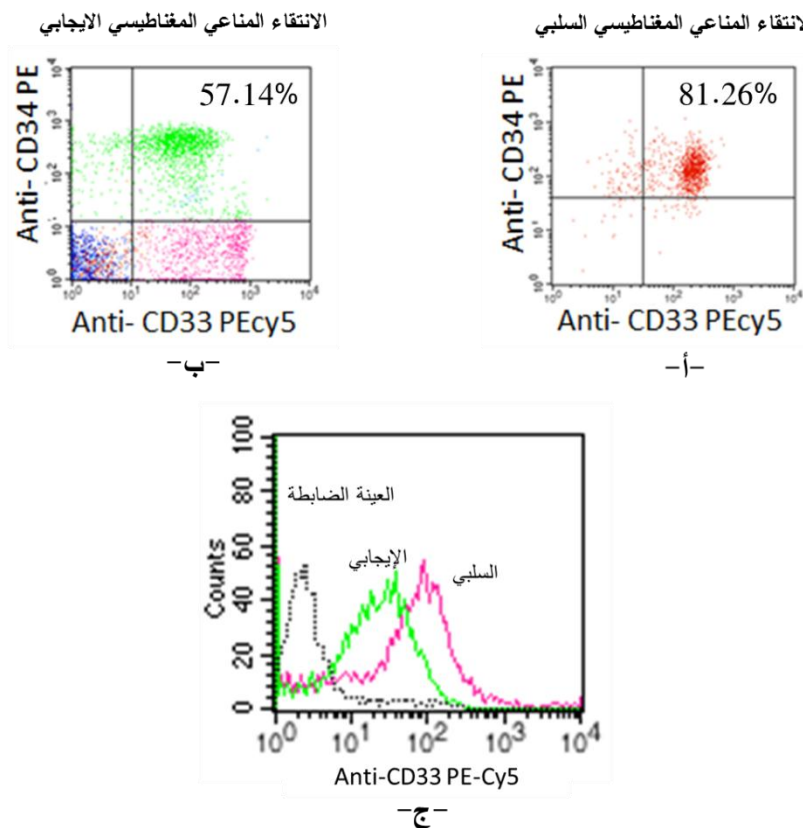
الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي



الشكل 4-10: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة HLA-DR (CD34⁺HLA-DR⁺)، وللخلايا الأقل نضجاً التي تعبر عن الواسمة CD34 ويغيب فيها التعبير عن الواسمة HLA-DR (CD34⁺HLA-DR⁻)، وذلك بعد عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي (أ) أو الايجابي المعدلة (ب). ج، مخطط هستوغرافي يوضح الفرق في عدد الخلايا CD34⁺ ومستوى تعبيرها عن المستضد HLA-DR، وذلك حسب طريقة الانتقاء. ويبدو واضحاً التراجع في التعبير عن الواسمة HLA-DR على سطوح الخلايا CD34⁺ المعزولة بطريقة الانتقاء الايجابي وغيابها تماماً على سطوح الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء السلبي.

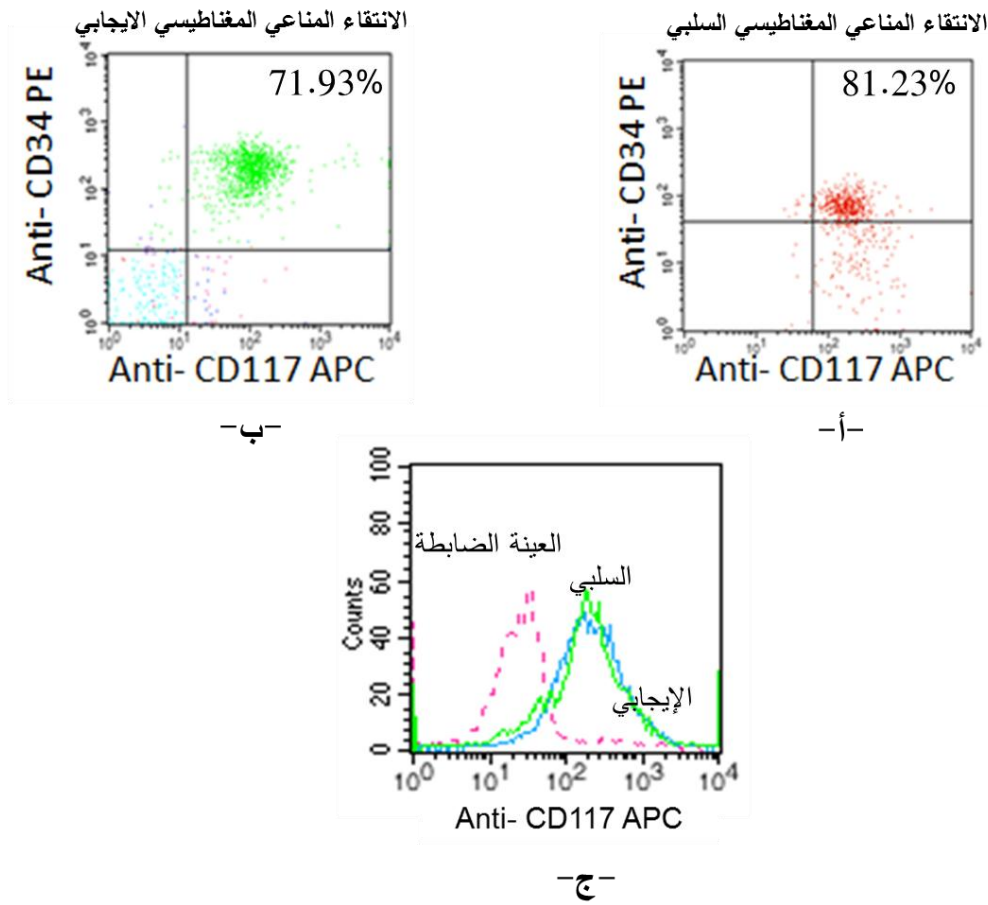
ونتم بالتتميط المناعي أيضاً التحري عن الخلايا الجذعية ذات الخصائص السلفية والتي التزمت التمايز القوي الأولي؛ حيث تم الكشف عن المستضد النقوي المبكر CD33 على سطوح الخلايا CD34⁺. وشوهد في هذه الدراسة نسبة مرتفعة من الخلايا CD34⁺ التي عبّرت عن المستضد CD33؛ حيث بلغ النمط الخلوي

CD34⁺CD33⁺ من نسبة الخلايا CD34⁺ (1.89±57.14 %) في العزل الإيجابي (الشكل 4-11، ب)، وبالمقابل سجّلت قيمة أعلى لنمط الخط النقيوي CD33⁺CD34⁺ (2.96±81.26 %) في العزل السّليبي (الشكل 4-11، أ)، بفرق إحصائي معنوي $p > 0.05$ وهذا يؤكد النتائج المذكورة أعلاه فيما يتعلق بتميز طريقة الانتقاء السّليبي للحصول على خلايا جذعية أولية غير ناضجة.



الشكل 4-11: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD33 (CD34⁺CD33⁺)، وذلك بعد عزلها بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي (أ) أو الايجابي المعدلة (ب). مخطط هستوغرام يوضح الفرق في التعبير عن المستضد CD33، للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34⁺ باختلاف طريقة الانتقاء، حيث تميزت الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء السليبي بتعبير مرتفع عن المستضد CD33.

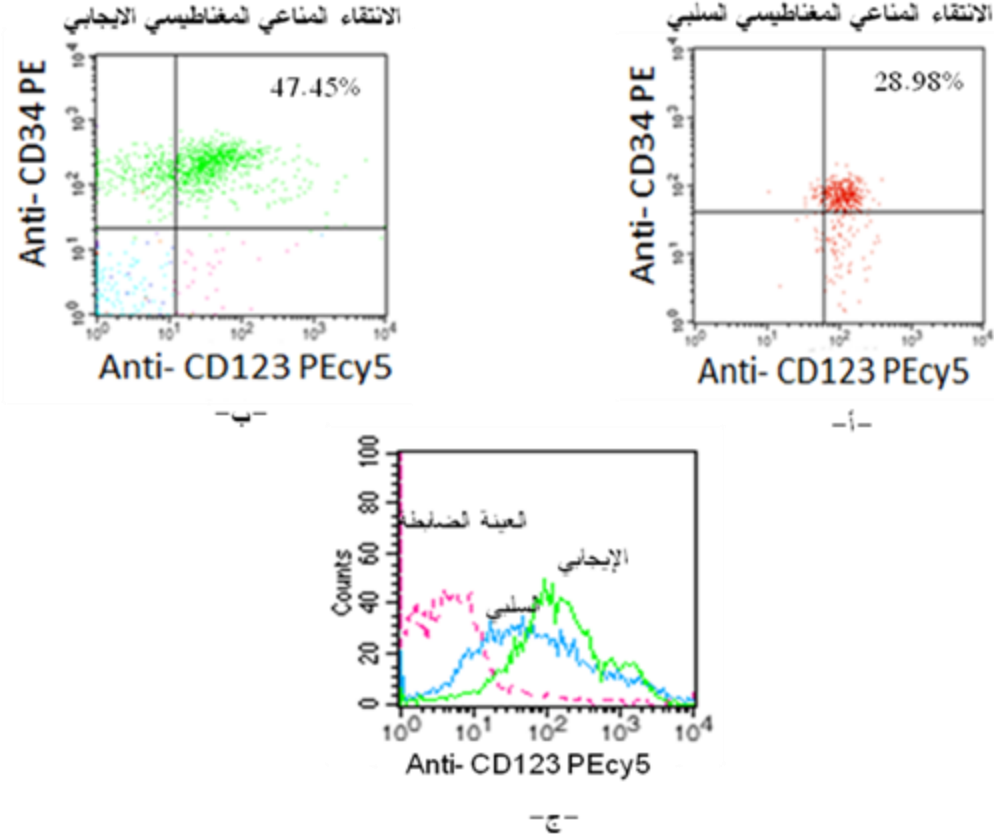
كما تمّ التحليل الكمي لنسبة الخلايا CD34⁺ التي تُعبّر عن الواسمة CD117 والتي يُعرف بأنّها تُميّز الخلايا الجذعية الحقيقية، وبيّنت النتائج ارتفاعاً كبيراً في تواتر التعبير عن هذا المستضد، حيث بلغت النسبة المئوية للجمهرة الخلوية CD34⁺CD117⁺ المعزولة بالطريقة الإيجابية المعدلة (71.93 ± 0.94 %) (الشكل 4-12، ب) في حين أنها بلغت في الطريقة السّليبية (81.23 ± 0.94 %) (الشكل 4-12، ب) بفرق معنوي $p > 0.05$.



الشكل 4-12: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34

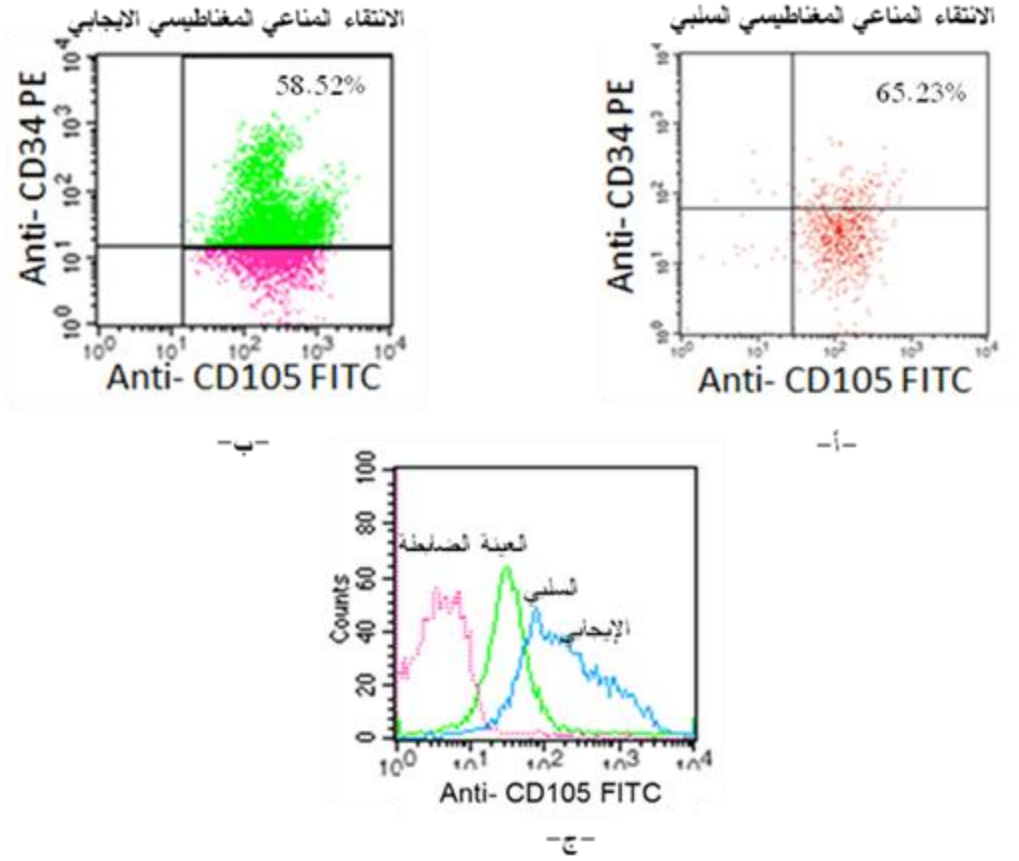
والواسمة CD117 ($CD34^+CD117^+$) التي تميز الخلايا الجذعية الحقيقية التي عزلت بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي (أ) أو الايجابي المعدلة (ب). مخطط هستوغرام يوضح التقارب في عدد الخلايا $CD34^+$ المعزولة في كلتا الطريقتين ودرجة تعبيرها عن المستضد CD117؛ حيث تميزت الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء السلبي بتعبير مرتفع قليلا عن المستضد CD117 بالمقارنة مع طريقة الانتقاء الايجابي المعدلة.

وبيّنت نتائج التتميط أيضاً أن دم الحبل السري احتوى نسبة مرتفعة من الخلايا $CD34^+CD123^+$ ($47.45 \pm 0.63\%$) المعزولة بالطريقة الايجابية المعدلة والتي مثلت السلانف النقية التي تتصف بقدرتها على الانقسام والتوسع النسيلي (الشكل 4-13، ب)، في حين لم تتجاوز نسبة هذه الخلايا ($28.98 \pm 0.31\%$) في الطريقة السلبية (الشكل 4-13، أ) بفرق معنوي $p > 0.05$.



الشكل 4-13: تمثيلات بيانية نقطية تبين الفرق في النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD123 ($CD34^+CD123^+$) التي عزلت بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي (أ) أو الإيجابي المعدلة (ب). مخطط هستوغرام يوضح ارتفاعا في عدد الخلايا $CD34^+$ التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD123 وذلك لدى عزلها بطريقة الانتقاء الإيجابي.

وكذلك، ارتفعت نسبة الخلايا $CD34^+$ التي عبرت عن المستضد CD105 الضروري لبقاء الخلايا في حالة فنية والهام خلال مراحل تمايز الخلايا المولدة للدم؛ حيث بلغت نسبتها المئوية (1.43 ± 58.52 %) ، بينما كانت النسبة المئوية أعلى (65.23 ± 0.79 %) في الطريقة السلبية، (الشكل 4-14، أ، ب) بفرق معنوي $p > 0.05$.



الشكل 4-14: تمثيلات بيانية نقطية تبين الفرق في النسبة المئوية للخلايا التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD105 ($CD34^+CD105^+$) التي عزلت بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي (أ) أو الايجابي المعدلة (ب). مخطط هستوغرام يوضح ارتفاعا في عدد الخلايا $CD34^+$ التي ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD105 وذلك لدى عزلها بطريقة الانتقاء السليبي.

إن مجموع نتائج التتميط للجمهورات الخلوية للخلايا الجذعية $CD34^+$ المعزولة بطريقة الإنتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابية المعدلة، ومقارنتها مع تلك الخاصة بالخلايا المعزولة بتطبيق الطريقة السلبية (الجدول 3-4)، بينت أن الخلايا في هذه الدراسة هي خلايا جذعية مؤلدة للدم ذات طابع مناعي يُميّز الخلايا الجذعية الحقيقية ($CD45^{bright} CD34^{bright} CD38^{dim/-} HLA-DR^{dim/-} CD33^+ CD117^+ CD123^+ CD105^+$ lineage⁻) والتي ارتفعت نسبتها بشكل كبير لدى تطبيق الطريقة السلبية بالمقارنة مع الطريقة الايجابية، وهذا اقترح الحصول على خلايا جذعية حقيقية لا تعبر عن المستضدات التي تُميّز خط خلوي مُحدّد وهي خلايا تُعبر عن المستضدات التي تميّز الطلائع الأولية للخط النقوي والتي تفيد في الزرعات طويلة الأمد وقصيرة الأمد، على التوالي.

الجدول 4-3: مقارنة النسب المئوية لتحت المجموعات الخلوية للخلايا الجذعية CD34+ بين طريقة الانتقاء

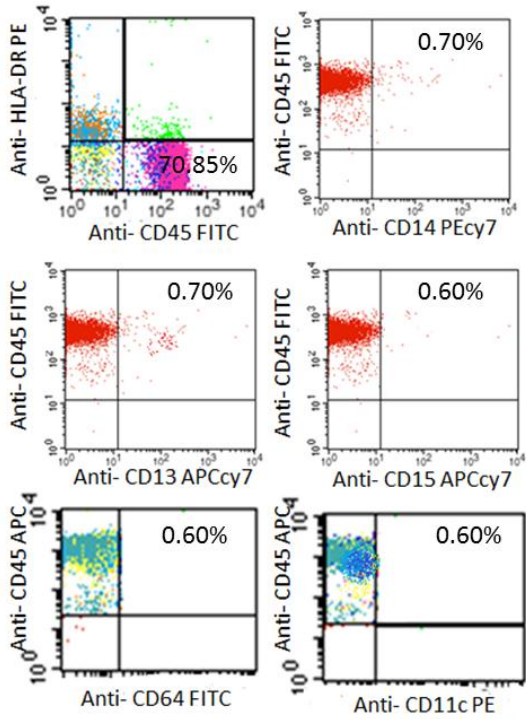
المناعي المغناطيسي الايجابي المعدلة وطريقة الانتقاء السلبي.

المتغيرات	الانتقاء المناعي المغناطيسي السلبي	الانتقاء المناعي المغناطيسي الإيجابي بعد التعديل	P= 0.05
% للخلايا CD34 ⁺ CD45 ⁺	2.25±82.18	6.66±71.85	P = 0.06
% للخلايا CD34 ⁺ CD38 ⁻	1.39±75.41	2.84±21.70	P < 0.001
% للخلايا CD34 ⁺ HLA-DR ⁻	0.25±85.29	0.14±70.85	P < 0.001
% للخلايا CD34 ⁺ CD33 ⁺	2.96±81.26	1.89±57.14	P < 0.00
% للخلايا CD34 ⁺ CD117 ⁺	2.94±81.23	0.94±71.93	P = 0.002
% للخلايا CD34 ⁺ CD123 ⁺	0.31±28.98	0.63±47.45	P < 0.00
% للخلايا CD34 ⁺ CD105 ⁺	0.79±65.23	1.43±58.52	P = 0.002

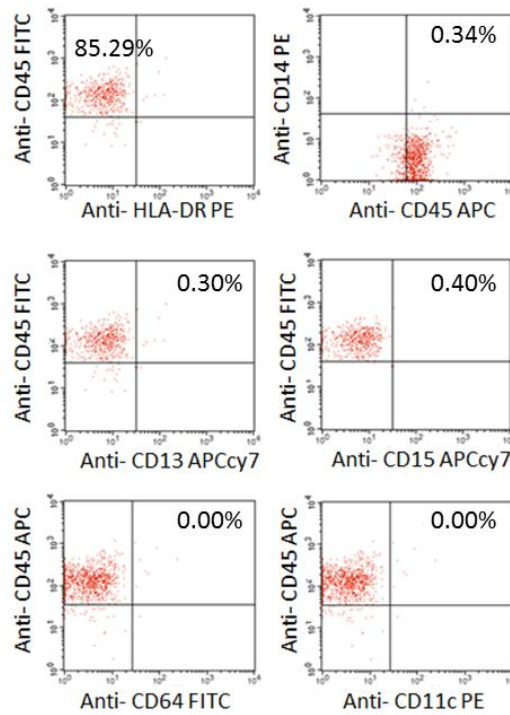
وللتأكد من نجاح عزل خلايا جذعية فتيّة ذات بنقاوة عالية، وأنه قد تم استنفاد جميع الأنماط الخلوية غير المرغوب بعزلها والتي تشكل الجزء الأكبر من مكونات الدم، حُدّد في هذه الدراسة تواتر الخلايا الجذعية CD34⁺ الناضجة. فتم التحري عن الخلايا التي تعبّر على سطوحها عن المستضدات السطحية التي تميز الخط اللمفي (CD3 أو CD4 أو CD7)، أو النقوي (CD13 أو CD14 أو CD15)، وبشكل خاص تلك التي تحمل على سطوحها المستضد النوعي للمفاويات البائية (CD19) أو للقتلة الطبيعيون (CD56) أو للعدلات (CD10)، أو مستضدات مشتركة توجد على سطوح العدلات ووحيدات النواة والبالعات (CD11c)، أو أخرى تميز وحيدات النوى والبالعات الكبيرة (CD64). وبينت النتائج، أنه بتطبيق طريقة العزل المناعي المغناطيسي الإيجابي يترافق عزل الخلايا الجذعية الحقيقية الفتيّة بعزل مجموعة صغيرة فقط من الخلايا CD34⁺CD45⁺ الناضجة التي تنتمي لخط للمفاويات التائية التي تعبّر عن CD4⁺، CD3⁺، CD7⁺، والتي بلغت نسبتها المئوية (0.12±5.22 %)، (0.34±4.78 %)، (0.23±5.32 %)، على التوالي. بينما لم تتجاوز النسبة المئوية للمفاويات البائية CD19⁺ القيمة (0.44±1.76 %). وانخفضت وبشكل كبير النسبة المئوية للخلايا السليفة التي تلتزم الخط الخلوي للقتلة الطبيعيين CD56⁺ (0.12±4.48 %) أو للعدلات CD10⁺ (0.07±1.15 %) أو لوحيدات النواة وللبالعات الكبيرة CD64⁺ (0.05±0.60 %) أو لوحيدات النوى D14⁺ (0.005±0.7 %). حيث اتصفت هذه الأخيرة بتعبير منخفض جداً عن المستضد CD11c أو CD13 أو CD15 (0.11±0.6 %، 0.11±0.7 %، 0.00±0.6 %،

على التوالي). بينما غابت وبشكل كامل تقريباً الخلايا التي تعبر عن هذه المستضدات، أو ظهرت بنسبة مئوية منخفضة جداً لدى تطبيق طريقة العزل المناعي المغناطيسي السلبي (الشكل 4-15).

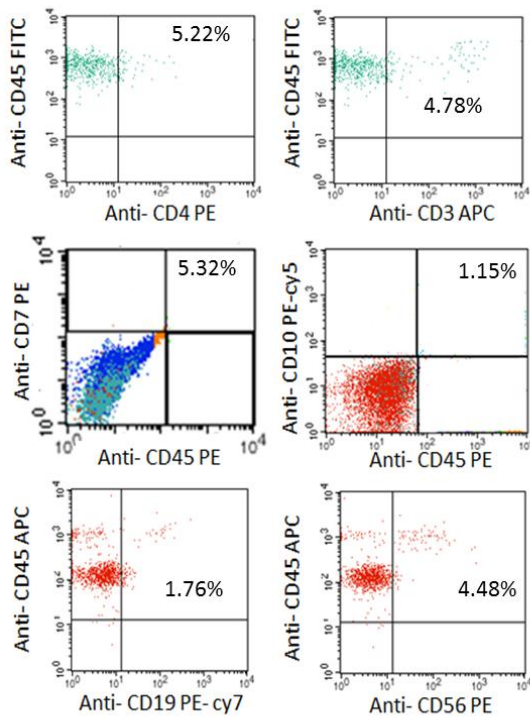
الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي



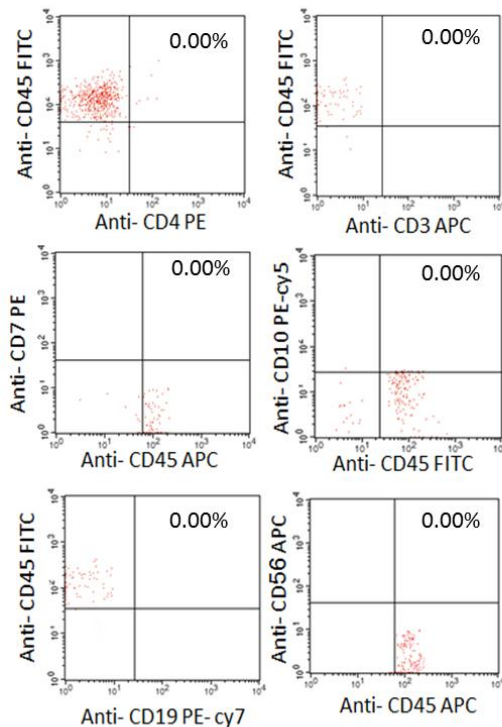
الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي



الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي



الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي



الشكل 4-15: تمثيلات بيانية نقطية أشارت إلى غياب المستضدات السطحية الدالة على وجود أنماط خلوية غير مرغوب بعزلها (CD4، CD3، CD10، CD7، CD19، CD56، CD14، CD13، CD15، CD64، CD11c، وذلك بتقنية الخلايا الجذعية المؤلدة للدم بالطريقة السلبية ومقارنتها مع الطريقة السلبية.

وبمقارنة النسب المئوية للخلايا الجذعية الفتية المعزولة (0.52 ± 85.29 % للخلايا CD45+HLA-DR- و 0.63 ± 86.76 % للخلايا CD45+CD33+) مع النسب المئوية للخلايا الناضجة (التي تعبر عن المستضدات التالية: CD3 أو CD4 أو CD7 أو CD13 أو CD14 أو CD15 أو CD19 أو CD56 أو CD10، أو CD11c أو CD64)، والتي بقيت مرافقة للخلايا الفتية (الجدول 4-4)، تبين أن تطبيق طريقة الانتقاء السليبي أدت إلى الحصول على خلايا جذعية CD34⁺ مولدة للدم حقيقية وبنسبة مئوية عالية وبنقاوة عالية جداً، وأنه تم التخلص من معظم الأنماط الخلوية المرافقة وغير المرغوب بعزلها. ووقت هذه النتائج، نتائج التتميط السابقة التي بينت أيضاً فعالية عالية للطريقة السلبية وخاصة في ما يتعلق بنقاوة الخلايا الجذعية المعزولة.

الجدول 4-4: مقارنة النسب المئوية للأنماط الخلوية المراد استنفادها والتي بقيت مرافقة للخلايا الجذعية CD34+ التي عزلت بطريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي أو الايجابي، ومقارنتها مع النسب المئوية للخلايا الجذعية الفتية CD34+CD45+HLA-DR- و CD34+CD45+CD33 بين طريقة الانتقاء المناعي المغناطيسي الايجابي المعدلة وطريقة الانتقاء السليبي.

المتغيرات	الانتقاء المناعي المغناطيسي السليبي	الانتقاء المناعي المغناطيسي الايجابي بعد التعديل	P= 0.05
% للخلايا CD45 ⁺ HLA-DR ⁻	0.52 ± 85.29	0.14 ± 70.85	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD33 ⁺	0.63 ± 86.76	0.50 ± 39.60	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD4 ⁺	0.00 ± 0.00	0.12 ± 5.22	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD3 ⁺	0.00 ± 0.00	0.34 ± 4.78	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD7 ⁺	0.00 ± 0.00	0.23 ± 5.32	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD19 ⁺	0.00 ± 0.00	0.44 ± 1.76	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD56 ⁺	0.00 ± 0.00	0.12 ± 4.48	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD14 ⁺	0.34 ± 0.02	0.05 ± 0.70	P=0.007
% للخلايا CD45 ⁺ CD11c ⁺	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.60	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD13 ⁺	0.30 ± 0.00	0.11 ± 0.70	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD64 ⁺	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.60	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD15 ⁺	0.40 ± 0.10	0.00 ± 0.60	P<0.001
% للخلايا CD45 ⁺ CD10 ⁺	00.00 ± 00.00	0.07 ± 1.15	P<0.001

4-4. استنبات الخلايا الجذعية المولدة للدم

استنبتت الخلايا $CD34^+$ المعزولة مباشرة من دم الحبل السري في الوسط النوعي للخلايا الجذعية المولدة للدم (StemLine[®] hematopoietic stem cell expansion medium; Sigma Aldrich, Germany)، والذي دُعِم ب 0.1 ميلي مول/ ميلي L-Glutamine، كما دُعِم الوسط بالمضادات الحيوية (100 وحدة دولية/ ميلي لتر من بنسلين/ ستربتومايسين penicillin/streptomycin. وأضيف للوسط الخال من المصل 25% من المصل البشري أو 25% من مصل جنين البقر أو كلا المصلين بتركيز 12.5% لكل منهما. وأضيف لكل من الأوساط مزيج من عوامل النمو والسيتوكينات المأشوية البشرية (IL-3، SCF، Flt3- ligand) بتركيز 50 نانوغرام/ ميلي لكل منها، والتي حَرَضت إكثار الخلايا الجذعية المولدة للدم.

غُسِلت الخلايا بالنَّبذ بعد اليوم الخامس من الاستنبات وتمَّ تعليقها في الوسط المغدِّي المُدعَّم بنفس التراكيب المُحرَّضة على الانقسام (IL-3، CSF، flt-3 ligand) وأضيفت العوامل المُحرَّضة على التمايز تجاه خط خلايا وحيدات النوى- بالعات كبيرة (IL-6 و M-CSF) بتركيز 50 نانوغرام/ ميلي لكل منها.

4-4-1. تقييم الزيادة في عدد الخلايا

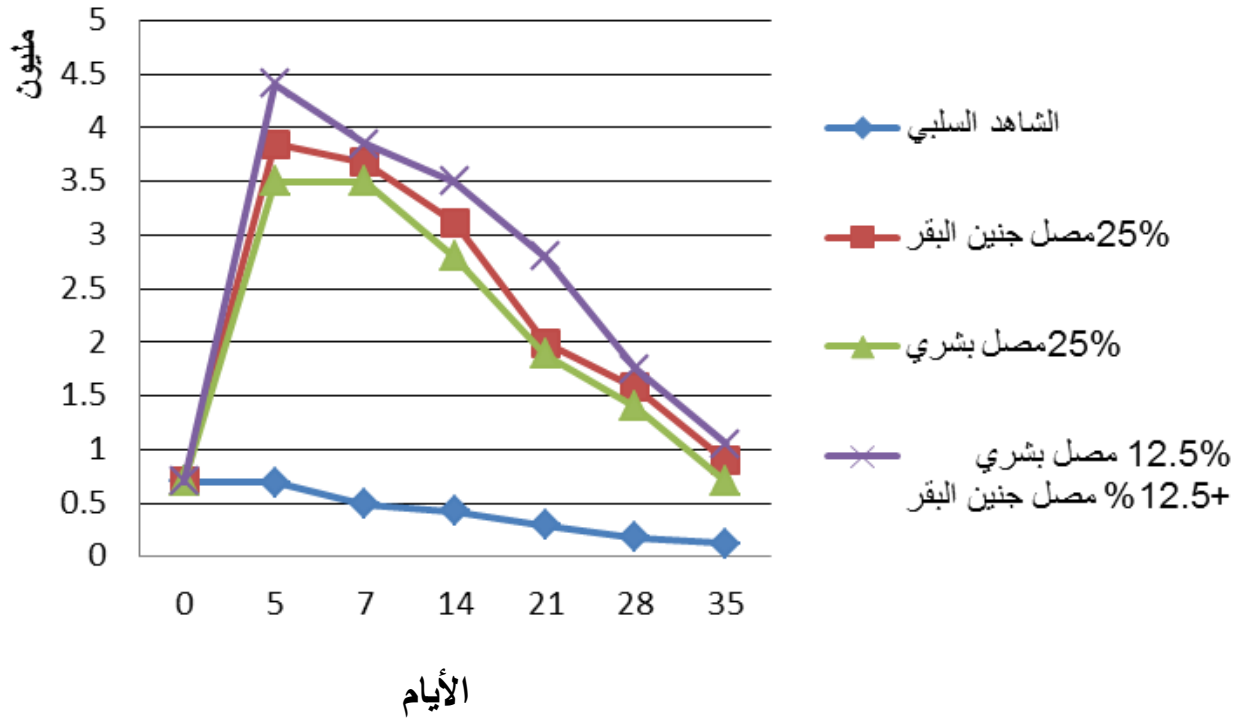
نمت الخلايا في الأوساط الثلاثة المختلفة من حيث نوع المصل المدعمة به ولوحظ زيادة في العدد الكلي للخلايا الحية في هذه الأوساط بالمقارنة مع عينة الشاهد السلبي الخالية الأمصال ومن عوامل النمو ومحرضات الانقسام والتمايز، وتحقق التمايز الخلوي الأعظمي في جميع الأوساط عند اليوم الخامس من الاستنبات بالنسبة للخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي الإيجابي باستثناء أن الخلايا المستتبة في عينة الشاهد السلبي انخفض فيها عدد الخلايا الحية تدريجياً حتى نهاية مرحلة الاستنبات، وبالمقابل كان سلوك انقسام الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي السلبي مختلفاً حيث زاد عدد الخلايا الحية في عينة الشاهد السلبي عند اليوم الخامس من الاستنبات ثم بدأت بالانخفاض تدريجياً حتى نهاية مرحلة الاستنبات (اليوم 35) في حين أن التَّمادي الأعظمي للخلايا المستتبة في الوسط المُدعَّم بالمصل البشري HS 25% والوسط المدعم بمصل جنين البقر FBS 25% تحقق عند اليوم 14 من الاستنبات وفي اليوم 21 بالنسبة للخلايا المستتبة في الوسط المدعم بكلا المصلين 12.5%HS+12.5%FBS الشكل (4-16).

وُجِدَ في كلتا حالتي الاستنبات (استنبات الخلايا الجذعية $CD34^+$ المعزولة بالطريقة السلبية و استنبات الخلايا $CD34^+$ المعزولة بالطريقة الإيجابية): أن الوسط المُدعَّم بالعوامل (IL-3، SCF، flt-3L، M-CFU،

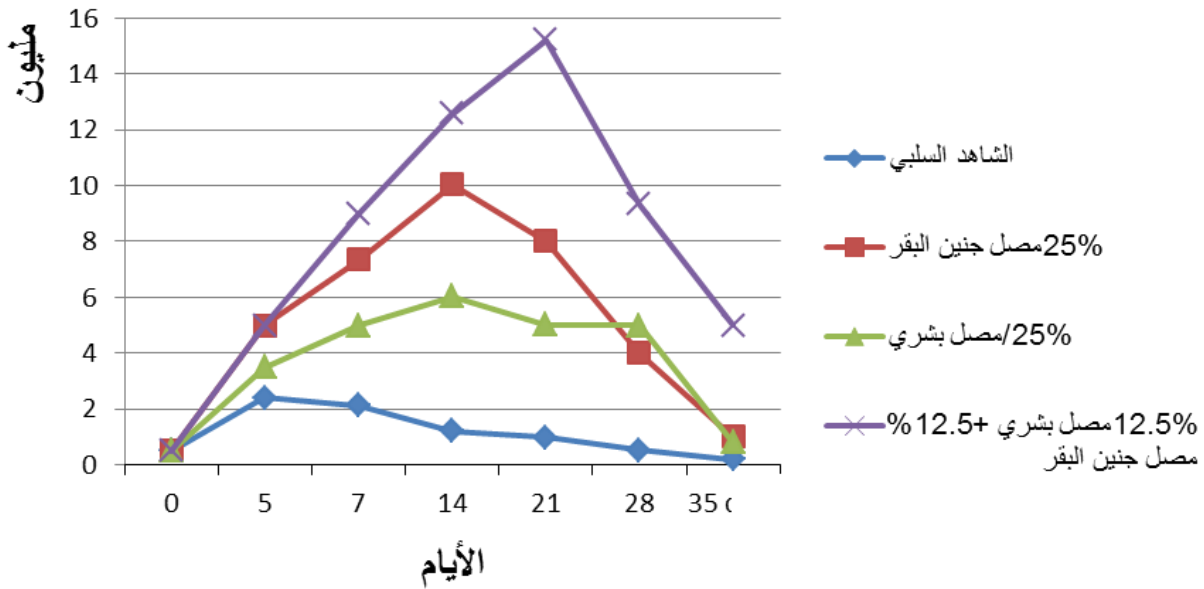
(IL-6) مع مصّل جنين البقر 25% FBS ساهم في تحفيز انقسام الخلايا الجذعية $CD34^+$ وتكثيرها حيث وصل عدد الخلايا كحد أعظمي إلى 4×10^6 خلية في اليوم الخامس من الاستنابات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية وبالمقابل كانت 5×10^6 خلية في اليوم الخامس من الاستنابات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية والتي استمرت في التزايد حتى 10×10^6 خلية كحد أعظمي في اليوم 14 من الاستنابات وفي كلتا حالتها الانتقاء لوحظ انخفاض تدريجي لعدد الخلايا الكلي خلال مراحل الاستنابات اللاحقة ومع ذلك لوحظت الزيادة مستمرة ومتفوقة بشكل أكبر من الوسط الذي دُعّم بالمصل البشري الذي لم يتجاوز فيه عدد الخلايا 3.5×10^6 خلية في اليوم الخامس من الاستنابات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و 6×10^6 خلية في اليوم 14 من الاستنابات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية كما هو موضح في الشكل (4-16).

بينما كان الوسط الذي دُعّم بمجموعة العوامل (IL-3، IL-6، M-CFU، flt-3L، SCF) وجمع بين نوعي المصلين بتراكيز متساوية 12.5% HS و 12.5% FBS الوسط الأنسب لتكثير الخلايا المستتبتة الشكل (4-16)، حيث كان عدد الخلايا فيه قد فاق عدد الخلايا في تركيبات الوسط الأخرى، وسجل القيمة الوسطية 4.5×10^6 خلية في اليوم الخامس للاستنابات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و 15×10^6 خلية في اليوم 21 من الاستنابات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية.

(أ): الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي



(ب): الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي



الشكل (4-16): تمثيل بياني خطي يشير إلى أثر نوع المصل على انقسام وعدد الخلايا الكلي خلال مراحل الاستنابت بعد عزل الخلايا بواسطة الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي والانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي.

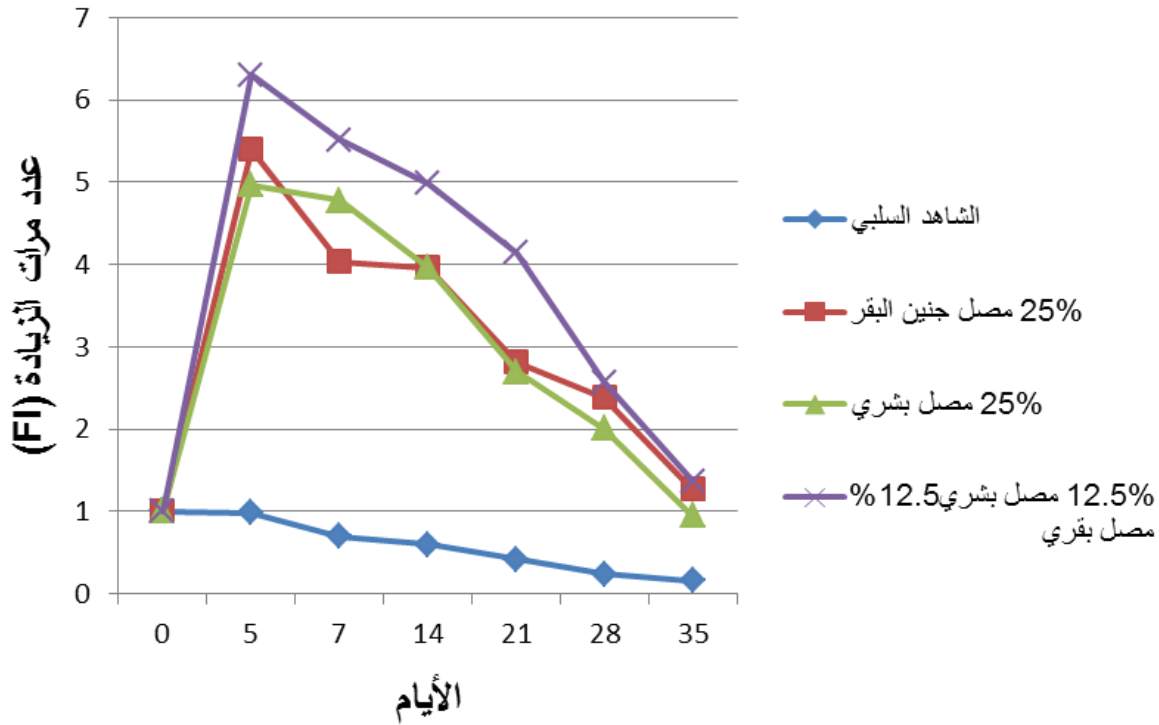
ولدى حساب متوسط عدد مرات الزيادة بالنسبة لعدد الخلايا الأولي المستنبت بعد انتقاء الخلايا مباشرة (اليوم 0)، وجد كما ذكر آنفاً أنه قد نمت الخلايا في الأوساط الثلاثة المختلفة من حيث نوع المصل المدعومة

به ولوحظ زيادة في عدد مرات الزيادة في هذه الأوساط بالمقارنة مع عينة الشاهد السلبي الخالي من الأمصال ومن عوامل النمو ومحرضات الانقسام والتمايز، كما تحقق التماذي الخلوي الأعظمي لعدد مرات الزيادة في جميع الأوساط عند اليوم الخامس من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي الإيجابي باستثناء أن الخلايا المستنبتة في عينة الشاهد السلبي انخفض فيها عدد الخلايا الحية تدريجياً حتى نهاية مرحلة الاستنبتات، وبالمقابل كان سلوك انقسام الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء المناعي السلبي مختلفاً حيث زاد عدد الخلايا الحية في عينة الشاهد السلبي عند اليوم الخامس من الاستنبتات ثم بدأت بالانخفاض تدريجياً حتى نهاية مرحلة الاستنبتات (اليوم 35) في حين أن التماذي الأعظمي لعدد مرات الزيادة للخلايا المستنبتة في الوسط المدعم بالمصل البشري HS 25% والوسط المدعم بمصل جنين البقر FBS 25% تحقق عند اليوم 14 من الاستنبتات وفي اليوم 21 بالنسبة للخلايا المستنبتة في الوسط المدعم بكلا المصلين 12.5%FBS+12.5%HS الشكل (4-17).

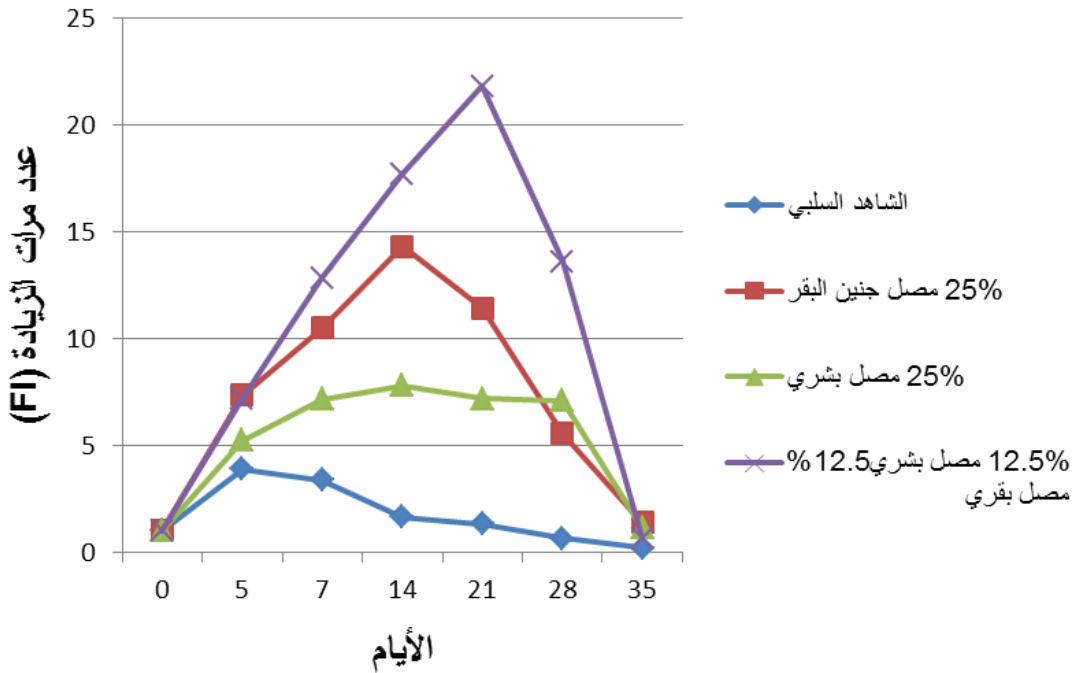
ووجد في كلتا حالتَي الاستنبتات (استنبتات الخلايا الجذعية CD34⁺ المعزولة بالطريقة السلبية و استنبتات الخلايا CD34⁺ المعزولة بالطريقة الإيجابية): أن الوسط المدعم بالعوامل (M-CFU، flt-3L، SCF، IL-3، IL-6) مع مصل جنين البقر 25% FBS ساهم في تحفيز انقسام الخلايا الجذعية CD34⁺ وتكثيرها حيث وصل عدد مرات الزيادة إلى 5 مرة في اليوم الخامس من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و 15 مرة في اليوم 14 من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية وفي كلتا حالتَي الانتقاء لوحظ انخفاض تدريجي لعدد الخلايا الكلي خلال مراحل الاستنبتات اللاحقة ومع ذلك لوحظت مستمرة ومنقوكة بشكل أكبر من الوسط الذي دُعِمَ بالمصل البشري الذي لم يتجاوز فيه عدد مرات الزيادة 5 مرة في اليوم الخامس من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و 7 مرة في اليوم 14 من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية كما هو موضح في الشكل (4-17).

بينما كان الوسط الذي دُعِمَ بمجموعة العوامل (M-CFU، flt-3L، SCF، IL-3، IL-6) وجمع بين نوعي المصلين بتراكيز متساوية HS 12.5% و FBS 12.5% الوسط الأنسب لتكثير الخلايا المستنبتة الشكل (13)، حيث كان عدد مرات الزيادة فيه قد فاق عدد مرات الزيادة في تركيبات الوسط الأخرى، وسجل القيمة الوسطية 6 مرة في اليوم الخامس من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية 22 مرة في اليوم 21 من الاستنبتات بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية.

(أ): الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي



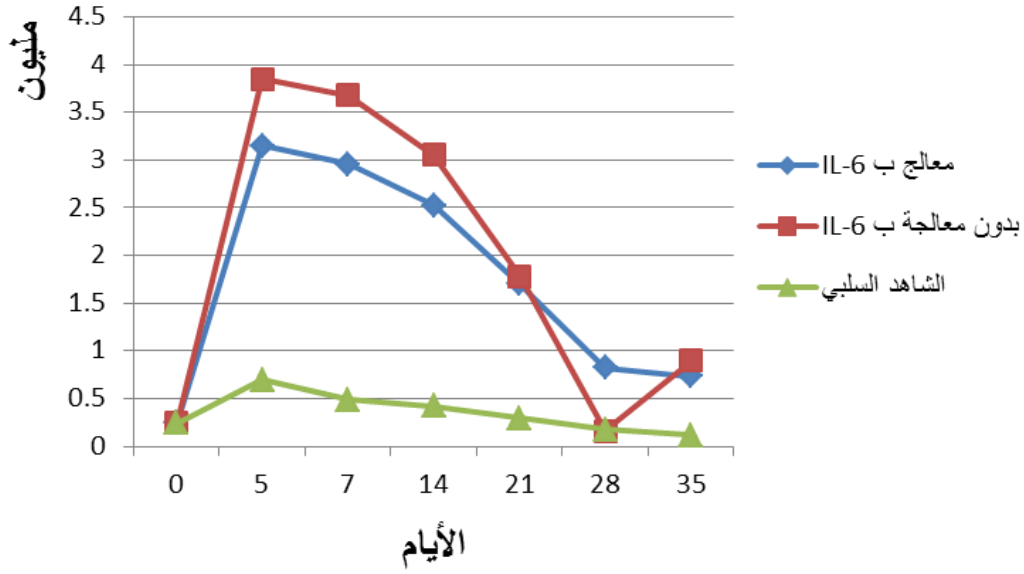
(ب): الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي



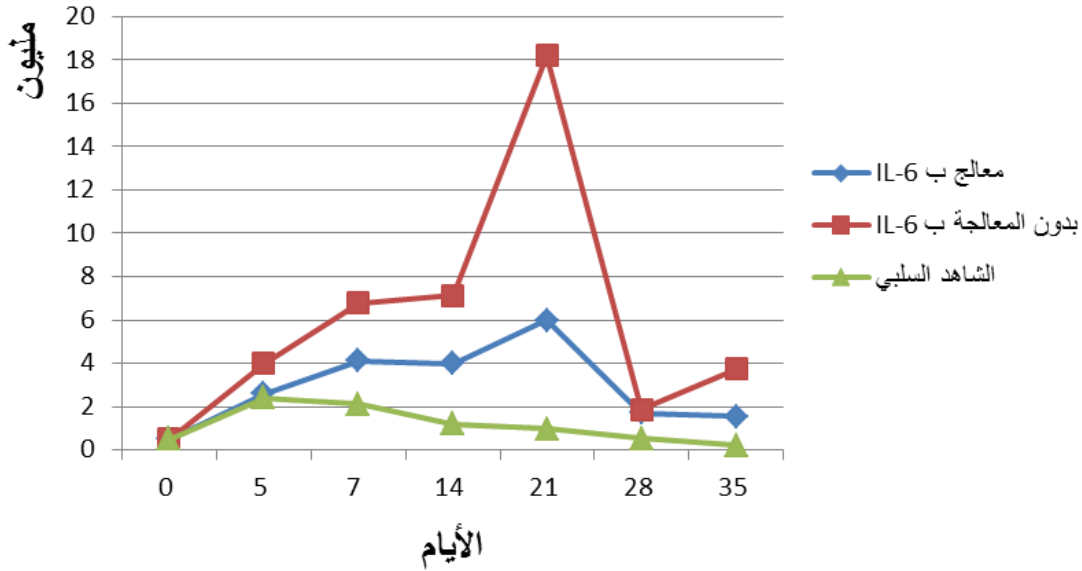
الشكل (4-17): تمثيل بياني خطي يشير إلى أثر نوع المصل على عدد مرات الزيادة في العدد الأولي للخلايا الجذعية المستتبة بعد عزلها بطريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي والانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي.

كما وجد أن غياب العامل IL-6 عن الوسط الذي دعم بالعوامل (IL-3، SCF، flt-3 ligand، M-CSF) وكلا المصلين 12.5%FB +12.5%HS قد حفز سيرورة التمايز وزاد من معدل انقسام الخلايا المتمايزة بالمقارنة مع تلك المستتبة بنفس الشروط والمضاف إليها العامل IL-6 وكذلك تلك في الشاهد السلبي المستتبة في وسط غابت فيه جميع العوامل المحفزة على النمو والانقسام والتمايز. فلدى تقييم الزيادة في عدد الخلايا المستتبة خلال مراحل الاستتبات وصل عدد الخلايا إلى $10^6 \times 4$ خلية كحد أعظمي في اليوم الخامس من الاستتبات في الوسط الذي غاب فيه العامل IL-6 بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و $10^6 \times 18$ خلية في اليوم 21 الاستتبات في الوسط الذي غاب فيه العامل IL-6 بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية كما هو موضح بالتمثيل البياني في الشكل (4-18)، في حين أن عدد الخلايا سجل قيم أقل في الوسط الذي دُعّم بالعامل IL-6 حيث وصل عدد الخلايا كحد أعظمي عند اليوم الخامس من الاستتبات إلى $10^6 \times 3.1$ خلية بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و $10^6 \times 6$ خلية عند اليوم 21 بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية.

(أ): الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي



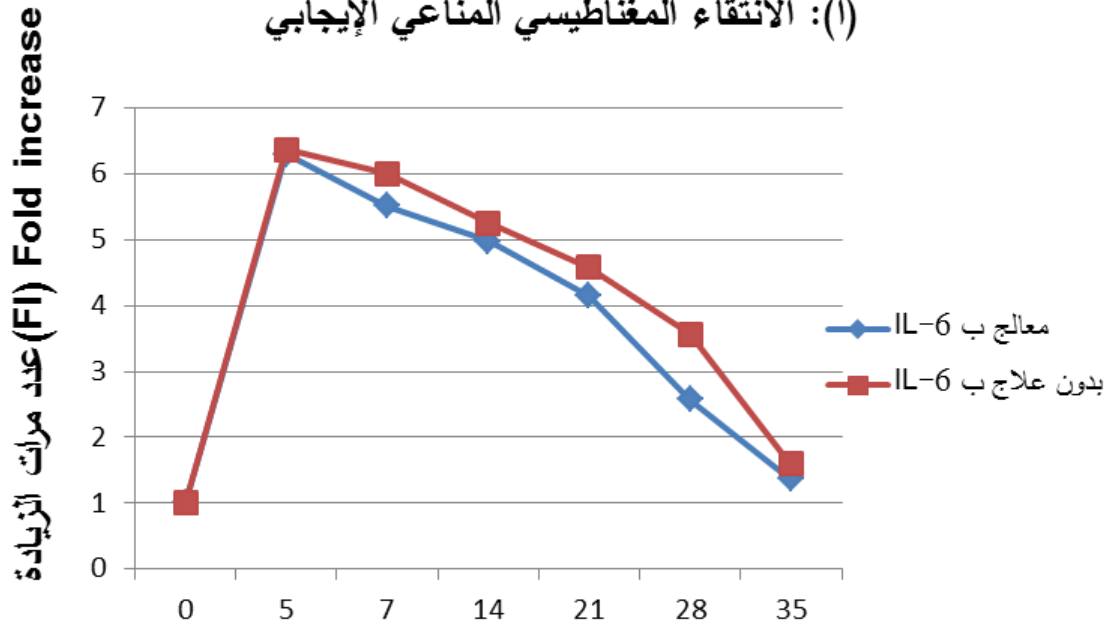
(ب): الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي



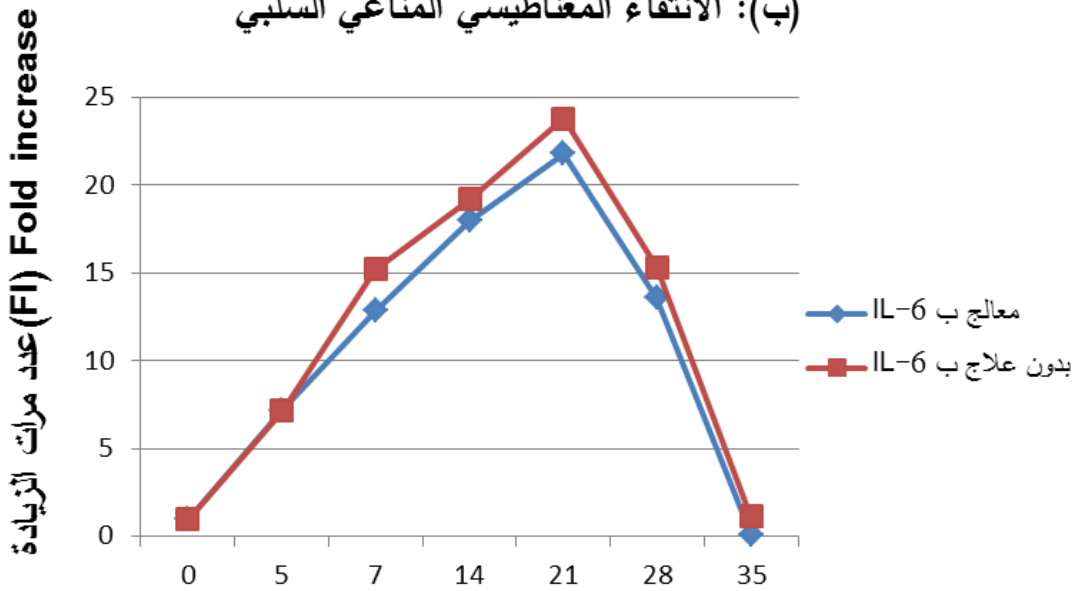
الشكل (4-18): أثر العامل إنترلوكين-6 في تحفيز انقسام الخلايا المعزولة بالطريقة الإيجابية والطريقة السلبية والمستنبطة في الوسط المدعم ب 12.5% مصلي بشري + 12.5% مصلي جنين البقر إلى جانب (عوامل الانقسام IL-3، SCF، Flt3-ligand، وعامل التمايز M-CSF).

أيضاً لدى تقدير متوسط عدد مرات الزيادة بالنسبة لمتوسط عدد الخلايا الأولى المستتبّة في (اليوم 0)، وُجِدَ أنّ غياب العامل IL-6 عن الوسط الذي دعم بالعوامل (M-CSF، flt-3 ligand، SCF، IL-3) وكلا المصلين 12.5%FB + 12.5%HS قد حفز سيرورة التمايز وزاد من معدل انقسام الخلايا المتميزة بالمقارنة مع تلك المستتبّة بنفس الشروط والمضاف إليها العامل IL-6 وكذلك تلك في الشاهد السلبي المستتبّة في وسط غابت فيه جميع العوامل المحفزة على النمو والانقسام والتمايز. فلدى حساب عدد مرات الزيادة للخلايا المستتبّة خلال مراحل الاستتبات وصلت إلى 23.77 مرة كحد أعظمي في اليوم الخامس من الاستتبات في الوسط الذي غاب فيه العامل IL-6 بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و 24 مرة في اليوم 21 الاستتبات في الوسط الذي غاب فيه العامل IL-6 بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية كما هو موضح بالتمثيل البياني في الشكل (5-19)، في حين أنّ عدد الخلايا سجل قيم أقل في الوسط الذي دُعّم بالعامل IL-6 حيث كان عدد مرات الزيادة كحد أعظمي عند اليوم الخامس من الاستتبات 6.3 مرة بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية و 21.79 مرة في اليوم 21 بالنسبة للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية.

(أ): الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي



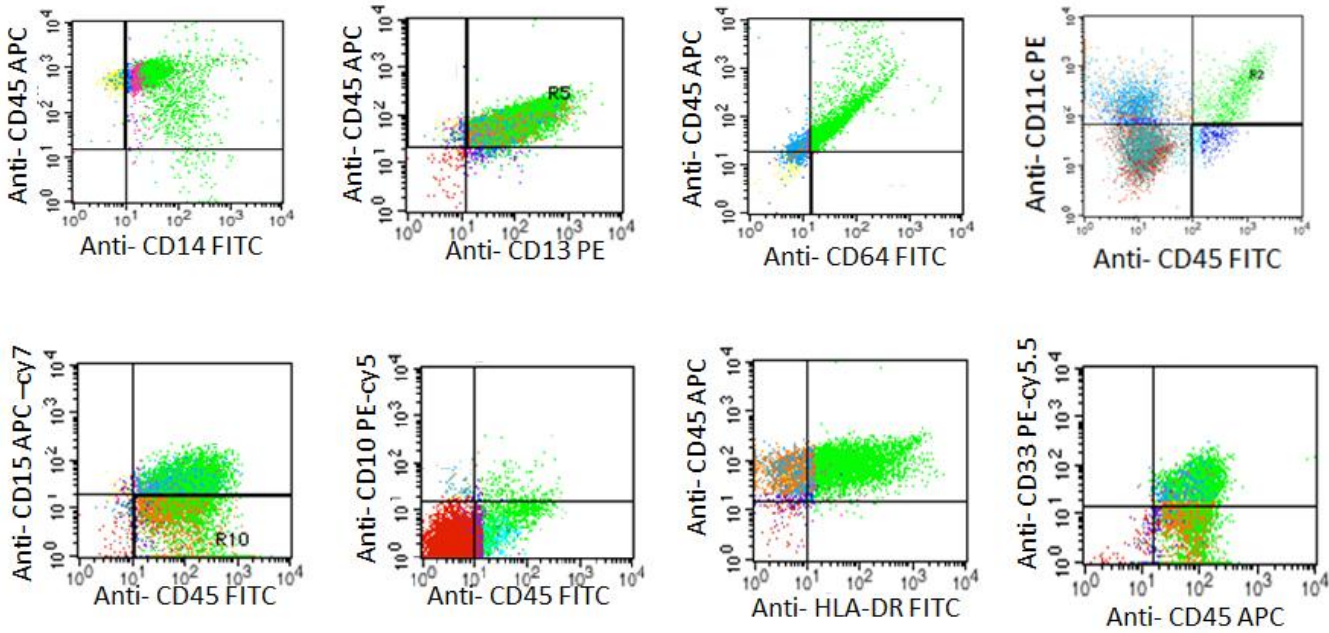
(ب): الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي



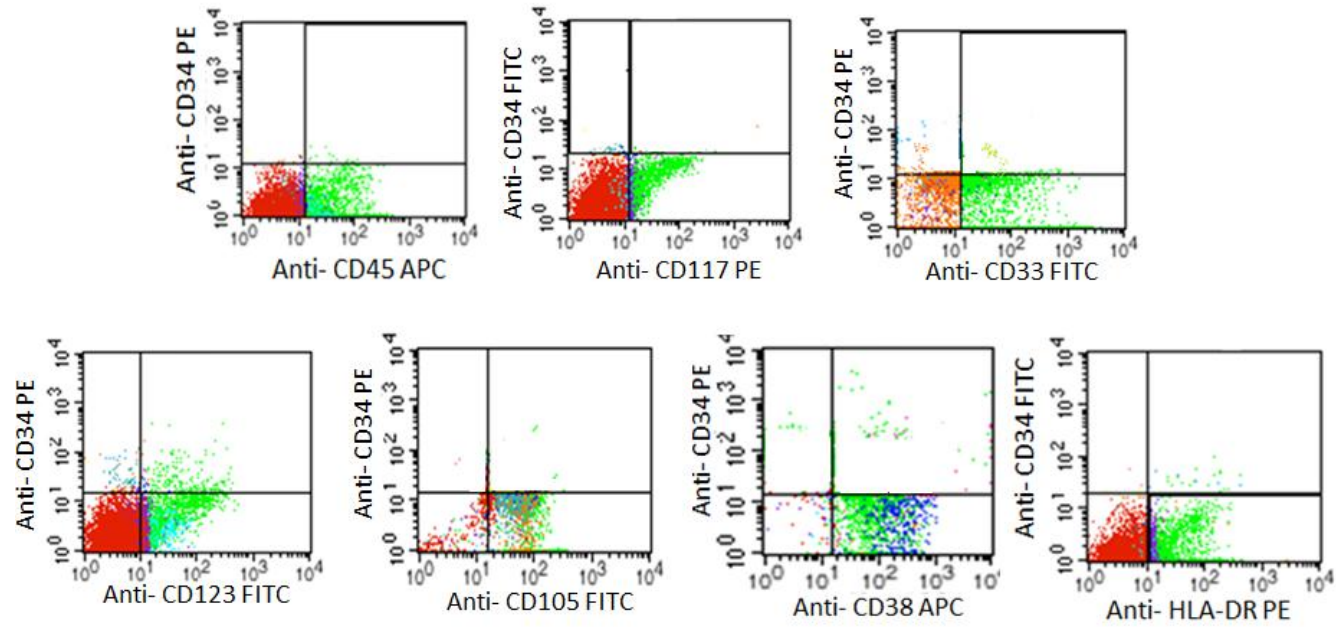
الشكل (4-19): أثر العامل إنترلوكين-6 في تحفيز انقسام الخلايا المعزولة بالطريقة الإيجابية والطريقة السلبية والمستتبة في الوسط المدعم بـ 12.5% مصل بشري + 12.5% مصل جنين البقر إلى جانب (عوامل الانقسام IL-3، SCF، Flt3-ligand، وعامل التمايز M-CSF).

2-4-4. تحليل النمط المناعي للخلايا المستتبة

سمح التتميط المناعي للخلايا المستتبة والمُحرّضة على التمايز نحو الخط الخلوي وحيدات- بالعات كبيرة بوساطة تقنية قياس الجريان الخلوي بمتابعة سيرورة تمايز الخلايا والمرتبطة بالتعبير عن مستضدات سطحية جديدة كما هو موضح في الشكل (4-20). حيث ظهرت جميعها في الربع العلوي اليميني للمجال الموجب لإشارة التفلور في التمثيلات النقطية لمستضد خلايا الدم البيضاء CD45 وللمستضدات الغشائية CD13، CD14، CD15، CD11c، CD64، HLA-DR، واستمرار التعبير عن المستضد النقوي CD33. كما تزامن هذا التعبير عن المستضدات الجديدة مع تراجع وغياب التعبير عن المستضد النوعي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34 مع المستضدات المميزة للخلايا الجذعية وسلفياتها الأولية كما هو موضح في الشكل (4-21) حيث خفتت أو غابت الإشارة في المجال الموجب للتفلور في الربع العلوي اليميني للتمثيلات النقطية للمستضد النوعي CD34 مع المستضدات الغشائية CD117، CD33، CD123، CD105، CD38، HLA-DR على الترتيب.

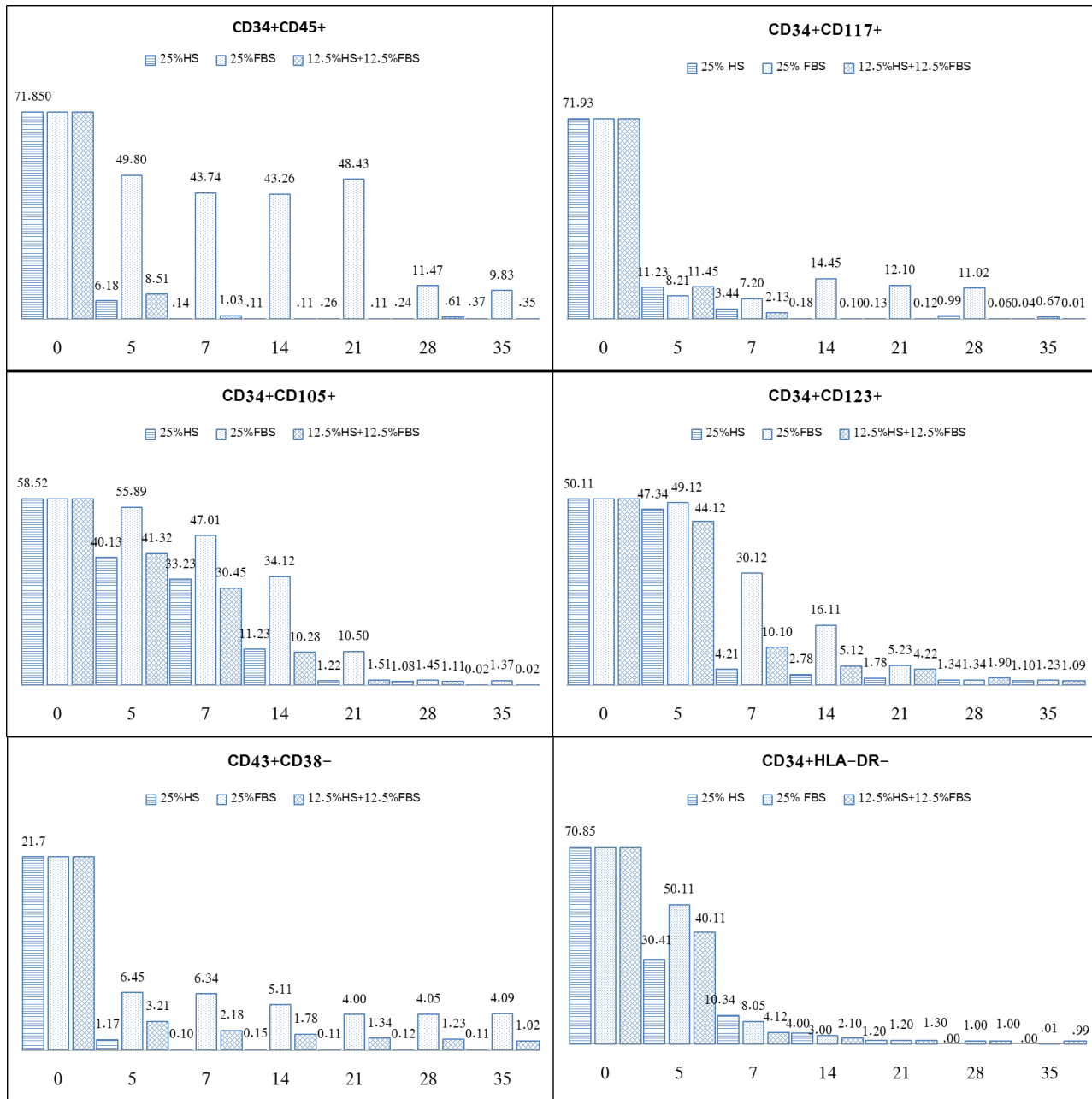


شكل (4-20): تمثيلات بيانية نقطية توضح تمايز الخلايا المستتبة بتعبيرها عن مستضد خلايا الدم البيضاء CD45 وظهور للمستضدات الغشائية الدالة على التمايز CD13، CD14، CD15، CD11c، CD64، HLA-DR، والمستضد النقوي CD33.

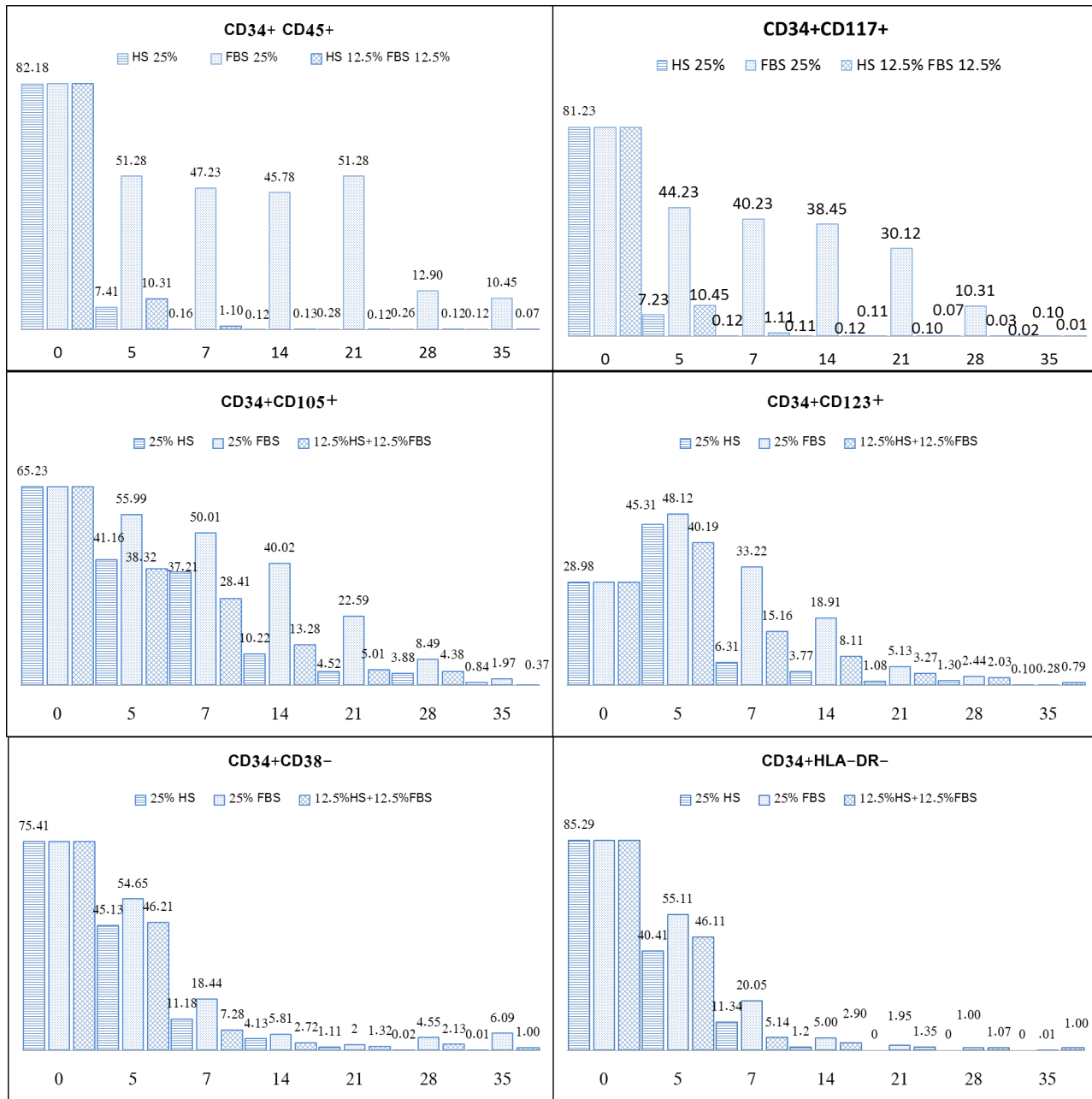


شكل (4-21): تمثيلات بيانية نقطية توضح فقدان التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية بعد عزل الخلايا واستنابتها إشارة إلى تمايزها حيث يغيب المستضد النوعي CD34، مع المستضدات الغشائية CD117، CD33، CD123، CD105، CD38 و HLA-DR على الترتيب.

كما تمّ التحري عن الوسط الأنسب لإكثار الخلايا $CD34^+$ دون تمايزها، فوجد أنّ الوسط المدعّم بالعوامل (IL-3، SCF، flt-3L، M-CFU، IL-6) ومصل جنين البقر بنسبة 25%FBS ساهم في صون التعبير عن مستضدات الخلايا الجذعية (CD34، CD117، CD105، CD123) بالمقارنة مع الأوساط التي دُعّمت بالمصل البشري إما بإضافته لوحده بنسبة 25%HS أو بإضافته بنسبة متساوية مع مصل جنين البقر 12.5%HS+12.5%FBS. وتمّ توضيح المقارنة بين الأمصال بالرسم البياني لمخططات أعمدة للنسب المئوية للتعبير عن المستضدات الغشائية النوعية للخلايا الجذعية $CD34^+$ كما هو مشار إليه في الأشكال: الشكل (4-22) للخلايا المنتقاة بالطريقة الإيجابية والشكل (4-23) للخلايا المنتقاة بالطريقة السلبية. وفي كلا الشكلين لوحظ انخفاض متدرج للتعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية بالتزامن مع المستضد النوعي CD34، إلا أنّ الخلايا المستنبتة في الوسط المدعّم بمصل جنين البقر 25% إلى جانب وجود العوامل (IL-3، SCF، flt-3L، M-CFU، IL-6) كان الأقل انخفاضاً بدءاً من ليلة الاستنابت 0 حتى اليوم 14 من الاستنابت حيث تراجعت نسب التعبير وتمايزت الخلايا وفقدت المستضدات المميزة للخلايا الجذعية. ويليهما في ذلك نسب التعبير للخلايا المستنبتة في وسط مدعّم بالمصل البشري 25%، ثمّ نسب الخلايا في الوسط المدعّم بكلا المصلين.



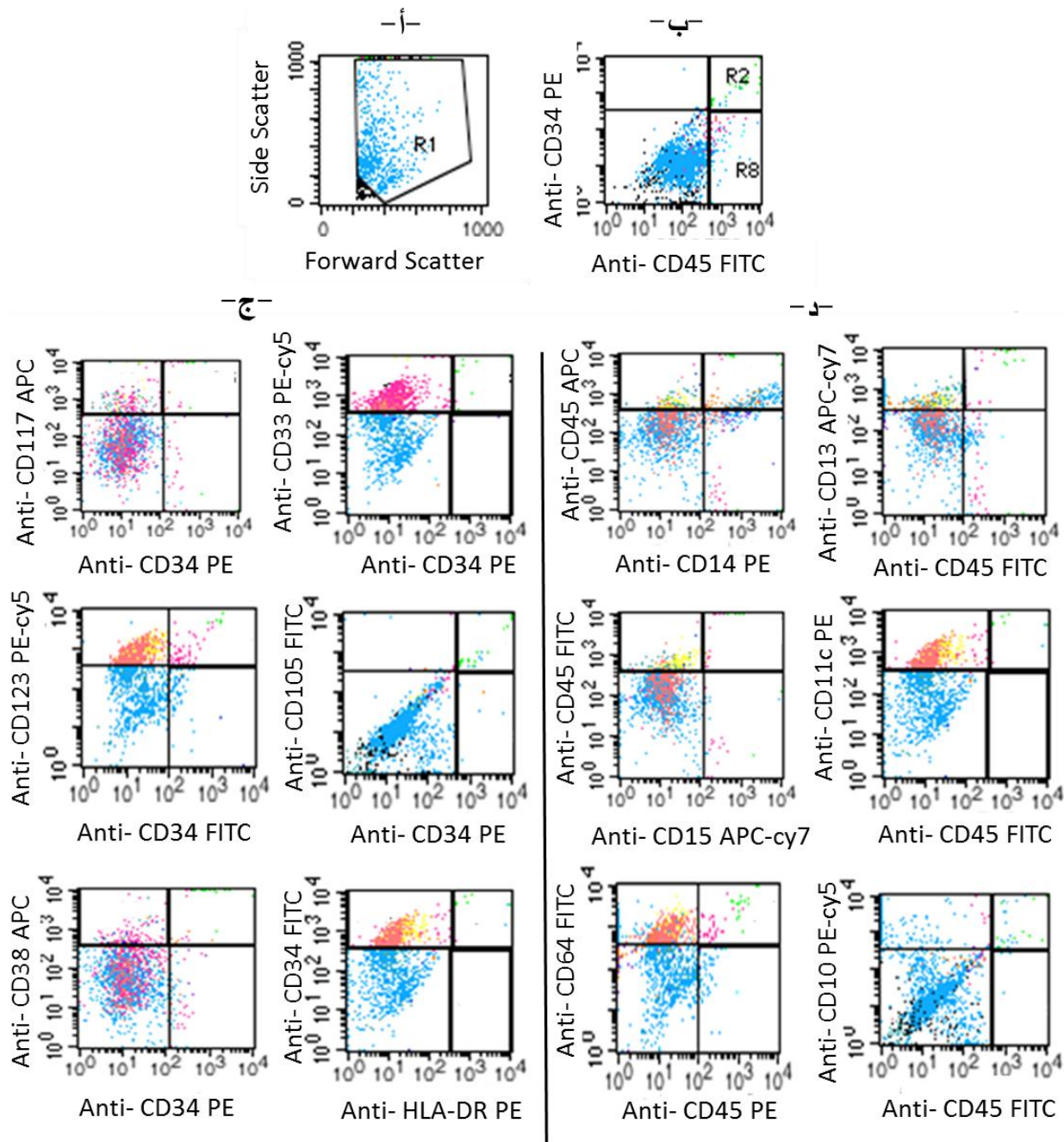
الشكل (4-22): مخططات أعمدة توضح أثر نوع المصل في صون التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم (المعزولة بالطريقة الإيجابية) خلال استنبات الخلايا وتحريضها على التمايز.



الشكل (4-23): مخططات أعمدة توضح أثر نوع المصل في صون التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم (المعزولة بالطريقة السلبية) خلال استنبات الخلايا وتحريضها على التمايز.

كما أنّ تحليل النمط المناعي للخلايا في الشاهد السلبى الذي غاب فيه إضافة كل من الأمصال وعوامل النمو والتمايز، سمح بملاحظة تمايز جزء بسيط من الخلايا رُصدت على محوري التبعثر الأمامى SSC والجانبى FSC للتمثيل البياني النقطة برسم البوابة R1 كما هو موضح في الشكل (أ: #) رغم انخفاض انقسامها والتراجع في حيويتها ففي الربع الأيسر الأدنى (LR) زادت نسبة الخلايا المتموتة مما استوجب تعديل إشارة التربع Quadrant نحو اليمين في التمثيلات البيانية النقطية بغرض استثناء جميع الخلايا غير الحية والأشلاء الخلوية، وانخفض التعبير حتى عن الجمهرة الخلوية $CD45^+CD34^+$ كما هو موضح في الشكل (4-24، ب) في الربع اليميني العلوي UR.

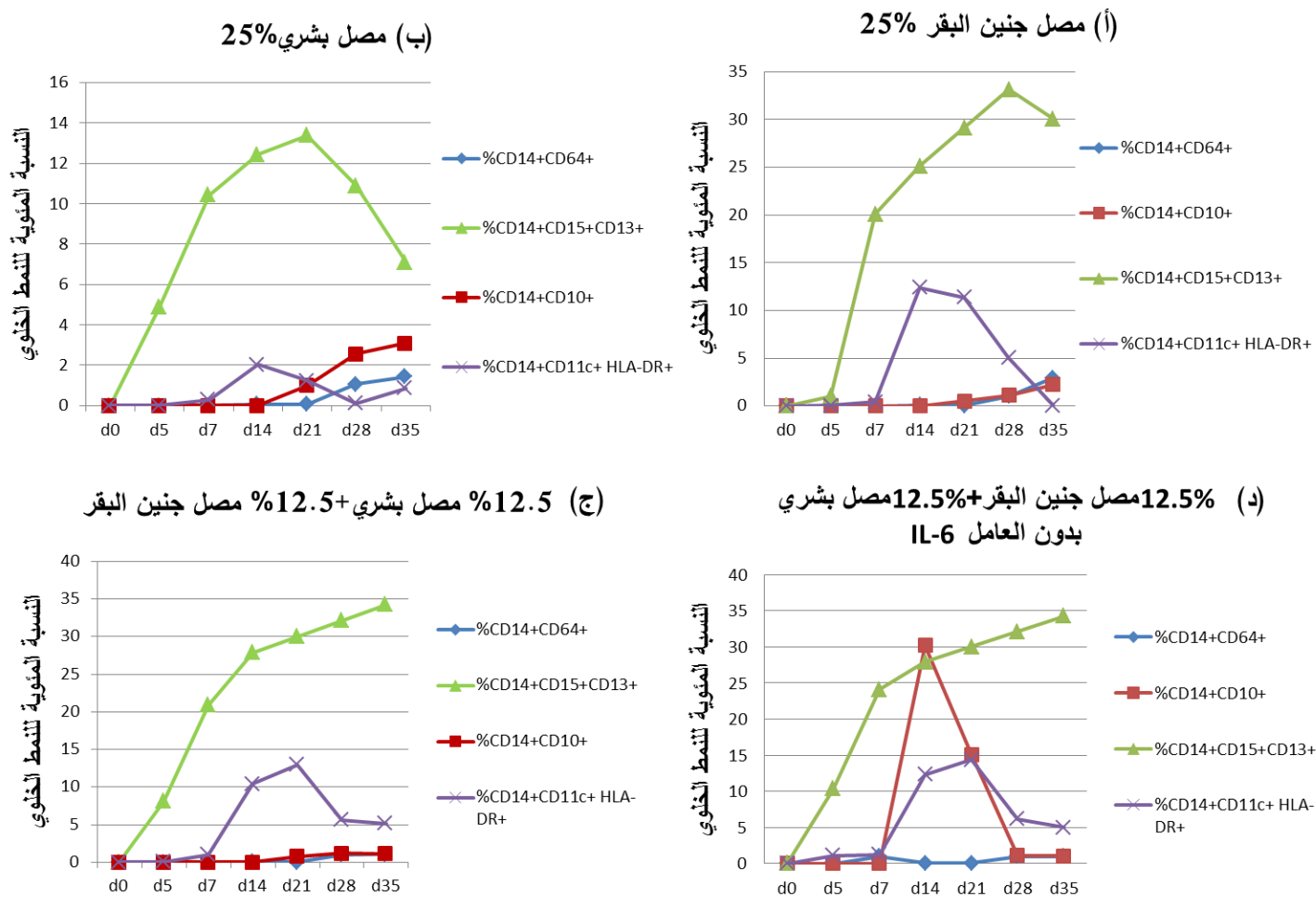
كما انخفض التعبير عن المستضدات المميزة للخلايا الجذعية عند دراسة النمط المناعي لخلايا الشاهد السلبي من خلال تتبع التعبير عن المستضد النوعي للخلايا الجذعية المولدة للدم CD34 وبقية المستضدات الغشائية المميزة للخلايا الجذعية (CD117، CD33، CD123، CD105، CD38، HLA-DR) كما هو موضح في الشكل (4-24، ج)، وبالمقابل ظهر تعبير عن مستضدات جديدة دلّت على تمايز الخلايا في الوسط المغذي Stem cell II Hematopoietic نحو وحيدات- بالعات كبيرة عبّرت عن المستضدات (CD14، CD13، CD15، CD11c، CD64، CD10) كما هو موضح في الشكل (4-24، د).



الشكل (4-24): النمط المناعي لخلايا الشاهد السلبي المتمييزة.

ووجد أن إضافة المصل البشري إلى وسط الاستنبات بتركيز 25% قد وجه تمايز الخلايا الجذعية نحو خلايا عدلات عبرت عن المستضدات CD14 CD10 بنسبة 4% مع غياب سريع لمستضدات الخلايا الجذعية بعد اليوم الخامس من الزرع في حين أن هذه النسبة كانت أقل من 2% بالنسبة للأوساط المدعمة بمصل جنين البقر 25% أو المدعمة بكلا المصلين بنسب متساوية 12.5% عند مقارنة التمثيلات البيانية الخطية (أ، ب، ج) في الشكل (4-25). بينما أن إضافة مصل جنين البقر مع المصل البشري بنسبة 12.5% لكل منهما إلى الوسط نفسه والمدعم بالسيتوكينات ذاتها، شكّل الوسط الأنسب لإكثار وتحريض تمايز الخلايا المستتبّة، إذ برز فيه الخط النقوي

CD33⁺، وتمايزت الخلايا إلى وحيدات عبرت عن المستضدات السطحية CD13، CD15، CD14 بنسبة 34% الشكل (4-25: أ) وهي تقريباً ضعف النسبة 14% الموجودة في الوسط المدعم بالمصل البشري فقط الشكل (4-25: ب)، كما وتمايزت الخلايا نحو البالعات كبيرة عبرت عن المستضدات السطحية CD14، CD11c، HLA-DR أيضاً كانت نسبتها 14% في الوسط المدعم بمصل جنين البقر الشكل (4-25: أ) وهي سبع أضعاف النسبة الموجودة في الوسط المدعم بالمصل البشري 2% في الشكل (4-25: ب).



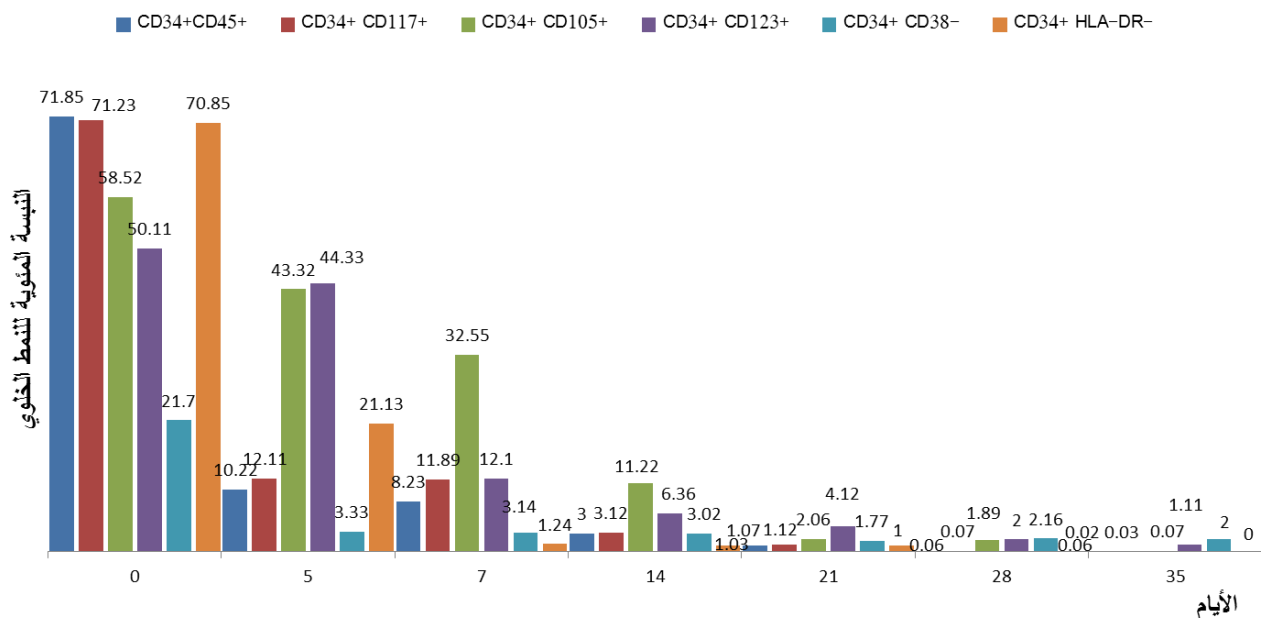
الشكل (4-25): تمثيلات بيانية خطية توضح أثر نوع المصل المضاف إلى وسط الاستنبات في توجيه تمايز الخلايا بالإضافة إلى أثر وجود أو غياب العامل انتروكين-6.

وتبين أنّ غياب أو حتى وجود العامل IL-6 في الوسط المدعم بمصل جنين البقر 12.5% والمصل البشري 12.5% لم يؤثر على ظهور الخلايا الوحيدات والبالعات الكبيرة، لأنّ الخلايا تمايزت وعبرت عن كل من مستضدات الوحيدات (CD14)، (CD13، CD15) ومستضدات البالعات الكبيرة (CD14، CD11c، HLA-DR) بنسبة زادت تدريجياً خلال مراحل الاستنبات حتى القيمة 35% و15% على التوالي في اليوم 21 من الاستنبات ثم تراجعَت خلال أيام الاستنبات اللاحقة الشكل

(20:ج ود)، إلا أن نسبة الخلايا العدلات في الوسط الذي غاب فيه العامل IL-6 كانت أعلى في اليوم 14 من الاستنابات حيث وصلت نسبتها حتى 30 % ثم بدأت بالتراجع خلال أيام الاستنابات اللاحقة الشكل (4-25: د).

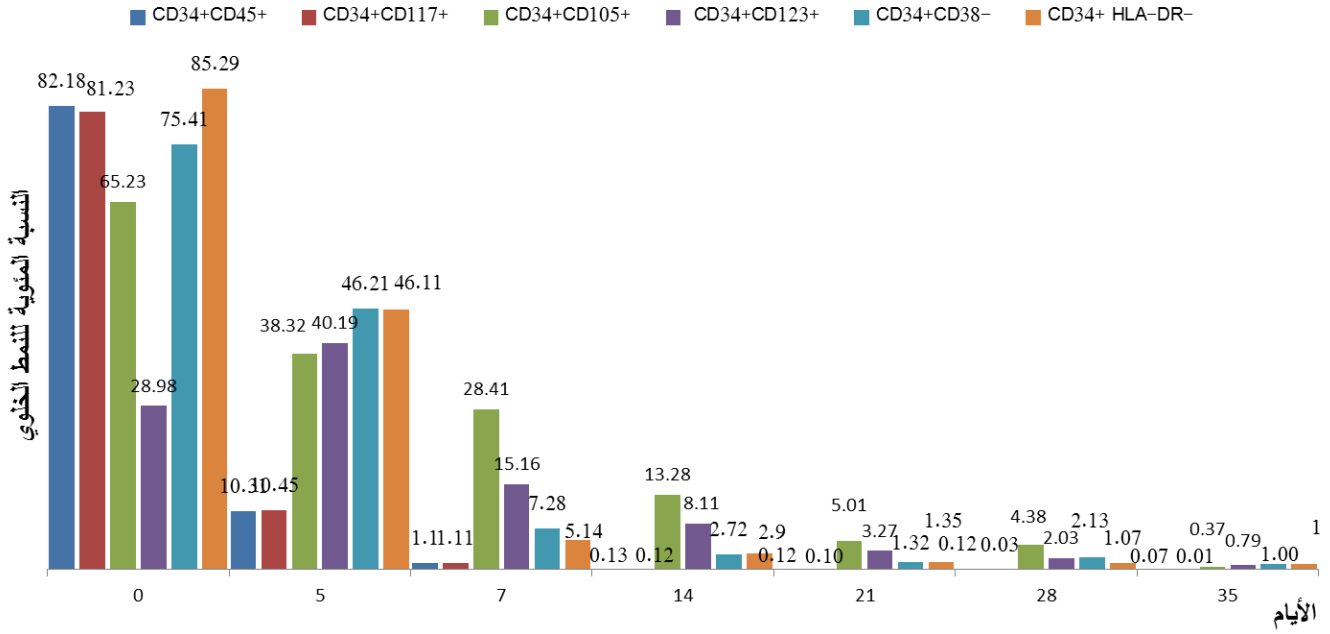
وبينت نتائجنا أيضاً أنّ إضافة الإنترلوكين-6 إلى وسط الاستنابات أدّى إلى صَوْن التعبير عن مستضدات الخلايا الجذعية CD34، CD117، CD105، CD123 خلال الأسبوعين الأول والثاني من الاستنابات (الأيام 0-14) من جهة، علماً أنها تراجعت في التعبير تدريجياً طيلة مدة الاستنابات، وبالمقابل كبح العامل IL-6 التعبير عن مستضدات التمايز CD14، CD64، والتي لم تتجاوز نسبة 1% من مجموع الخلايا المتميزة الشكل (4-25: ج) بالمقارنة مع تلك المعاملة بـ IL-6 والتي كانت نسبتها 30% من مجموع الخلايا المتميزة الشكل (4-25: د) باستثناء الواسمة CD33 و HLA-DR، في حين أنّ غيابه حفّز سيرورة التمايز للخلايا. وبدا ذلك جلياً لدى استنابات الخلايا الجذعية في كلتا الحالتين سواء المنتقاة بالطريقة الإيجابية أو المنتقاة بالطريقة السلبية كما هو موضح في الشكل (4-26) والشكل (4-27) على التوالي.

الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي / بدون المعالجة بـ IL-6



الشكل (4-26): أثر غياب العامل انترولوكين -6 في تمايز الخلايا المستتبّة وانخفاض التعبير عن المستضدات السطحية المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم.

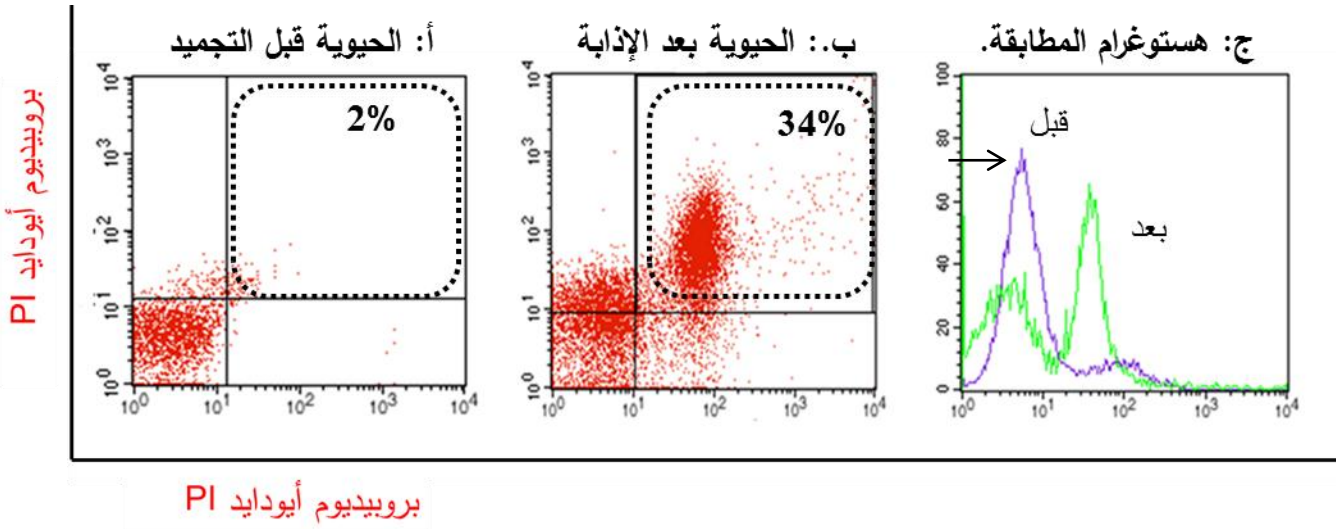
الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي/ بدون المعالجة ب IL-6



الشكل (4-27): أثر غياب العامل انترولوكين -6 في تمايز الخلايا المستنبته وانخفاض التعبير عن المستضدات السطحية المميزة للخلايا الجذعية المولدة للدم.

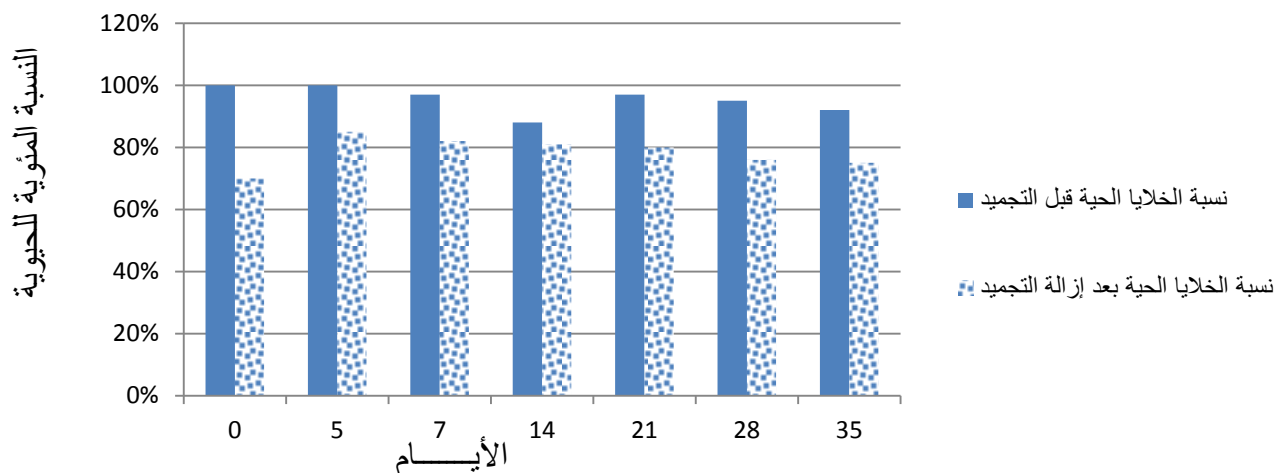
4-5. استنبات الخلايا الجذعية المُجمّدة

تم التحري عن إمكانية حفظ عينات من الخلايا الجذعية المولدة للدم CD34⁺ المعزولة من دم الحبل السري البشري بتجميدها في درجات حرارة منخفضة ولفترات زمنية تراوحت بين (5-6 أشهر)، استنبتت فيها الخلايا بعد فك تجميدها الفقرة (3:9) في ظروف استنبات مماثلة تماماً لاستنبات الخلايا الطّازجة وغير المُجمّدة، ووجد أنّ حفظ الخلايا بالتجميد أدى إلى انخفاض عدد الخلايا الحية بنسبة وصلت إلى 34% بعد إزالة التجميد، كما أبدت الخلايا المُجمّدة نتائج مشابهة للخلايا غير المُجمّدة من حيث الاستنبات والتّمايز الشكل (4-28).



الشكل (4-28): يشير إلى انخفاض حيوية الخلايا التي حفظت بالبرودة، حيث نلاحظ في (أ) شبه خلو الربع العلوي اليميني من الحادئات الملونة بالبروبيديوم أيودايد كدليل على حيوية الخلايا المقدر بـ 98% بالمقارنة مع الربع العلوي اليميني في (ب) الذي ضم حادئات (جمهرة خلوية غير حية) نفذ عبر جدرانها الصباغ البروبيديوم أيودايد ولون الـ DNA وقدرت نسبة الحيوية 66%، وفي التمثيل الهستوغرام (ج) مطابقة لمخططي هستوغرام الأول مثل إشارة لحيوية الخلايا قبل التجميد والثاني مثل إشارة انزاحت نحو يمين المخطط مما دلّ على انخفاض هذه الحيوية بعد الإذابة وإزالة التجميد.

ويتتبع النسبة المئوية لحيوية الخلايا خلال أيام الاستتبات، وُجد أنّ تجميد الخلايا مدة من الزمن (5-6 أشهر) ثمّ فكّ تجميدها واستتباتها من جديد قد خفّض من حيويتها بالمقارنة مع الخلايا غير المجمدة والمستتبتة في نفس الشروط بمقدار 30% بعد فكّ التجميد بالنسبة للخلايا غير المجمدة لتعود وترتفع نسبة الخلايا الحية معوضة 15% من حيويتها وتستقر بعد ذلك حتى اليوم 21 من الاستتبات لتبدأ بالتراجع ولكنها ليس أقل من 75% حيوية في اليوم 35 من أيام الاستتبات، كما هو موضح في مخطط الأعمدة المزدوج الشكل (4-29).



الشكل (4-29): مخطط أعمدة للنسب المئوية لحيوية الخلايا المقدر بتلوين الخلايا الميتة بالصبغ المتألق بروبيديوم أيودايد، والذي يوضح انخفاض حيوية الخلايا التي جُمِدت ثم أُزيل تجميدها واستتبتت بنفس شروط استتبات الخلايا التي لم تجمد واستتبتت طازجة بعد العزل مباشرة.

4-6. تمايز الخلايا الجذعية

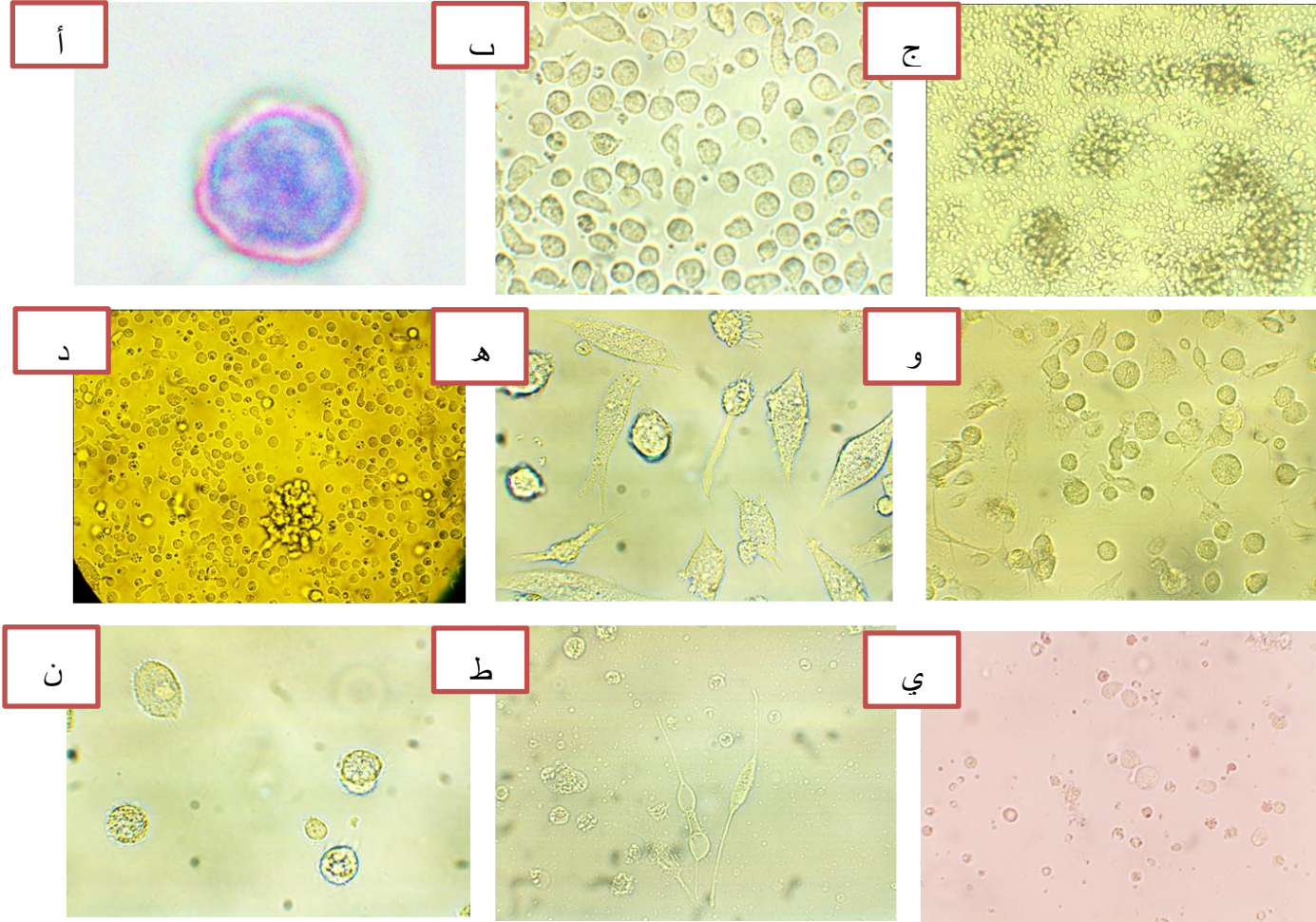
4-6-1. دراسة شكل الخلايا خلال الاستتبات

تميّزت الخلية الجذعية المولدة للدم بشكلها المشابه لشكل الخلية اللمفاوية من حيث حجمها تحت العدسة الغاطسة للمجهر الضوئي فنواتها كبيرة شغلت مجمل مساحة الخلية الداخلية، ومحاط بها مجال سيتوبلازمي ضيق الشكل (4-30: أ)

كما بدت الخلايا الجذعية المكونة للدم منذ عزلها وحتى اليوم الخامس من استتباتها تحت المجهر المقلوب بشكل كرات صغيرة بقيت معلقة في وسط الاستتبات الشكل (4-30: ب)، ولوحظ في الأوساط التي دعمت بالأمصال وعوامل الانقسام تشكل نائل خلوية معلقة بعد الأسبوع الأول حتى نهاية الأسبوع الثاني من الاستتبات الشكل (4-30: ج ود). أما الخلايا المستتبتة في الوسط الخال من عوامل النمو والعوامل المحرصة على الانقسام والتمايز أخذت بالتراجع تدريجياً خلال استتباتها ومجمل المشاهدات كانت لأشلاء وبقايا خلوية إلى جانب ندرة الخلايا الملتصقة أوالمتمايزة الشكل (4-30: ي).

وفي الأوساط المدعمة كان من السهل مشاهدة نمو وانقسام الخلايا المستتبتة الشكل (4-30: ط) حيث بدأ جزء من الخلايا بالالتصاق في قاع أطباق الزرع بعد الأسبوع الأول من الاستتبات استجابة لعوامل التمايز، وأخذت شكلاً مغزلياً أو حافظت على شكلها الدائري حسب نوع المصل الموجود في وسط الاستتبات.

حيث لوحظ أن الخلايا المستتبة في الوسط المدعم بمصل جنين البقر 25% تميزت بشكلها الدائري في حين أن الخلايا المستتبة في الوسط المدعم بالمصل البشري 25% كان لها شكلاً مغزلياً متطاولاً، ولوحظت الخلايا بشكلها المغزلي والدائري في الوسط الذي دعم بكلا المصلين البشري والبقري بنسب متساوية 12.5% الشكل (4-30: هـ، و، ن).



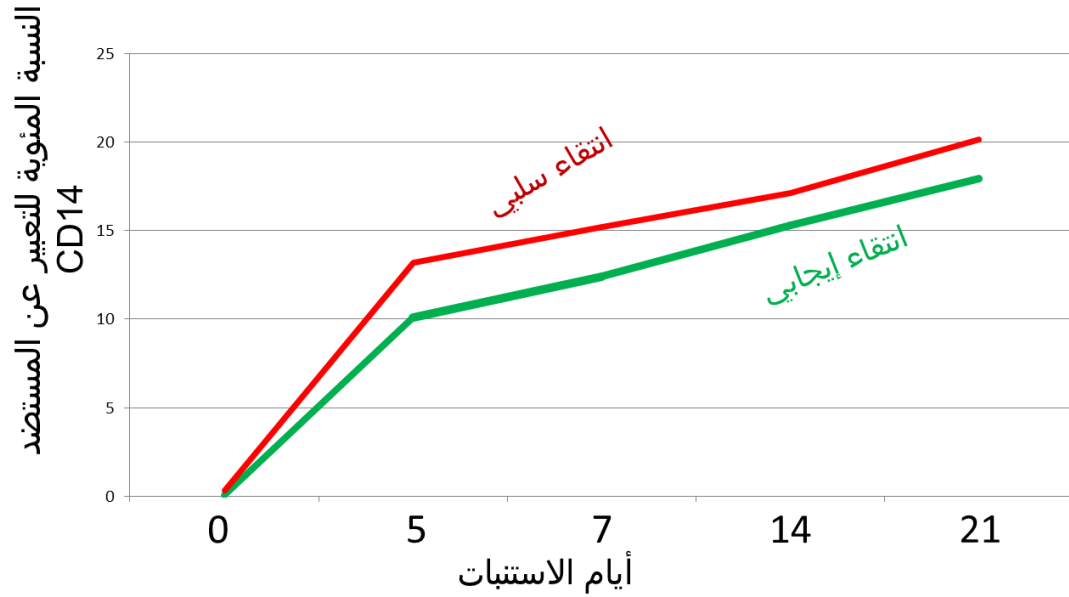
الشكل (4-30): تتابع لمراحل استنبات (نمو وانقسام وتمايز) الخلايا الجذعية المولدة للدم.

(أ) : الخلية الجذعية المولدة للدم ملونة بملون غيمزا تحت العدسة الغاطسة تكبير 1000X. (ب): الخلايا الجذعية المولدة للدم تحت المجهر المقلوب معلقة في وسط الاستنبات تكبير 400X. (ج): النسائل الخلوية للخلايا الجذعية المولدة للدم تحت المجهر المقلوب معلقة في وسط الاستنبات تكبير 200 X. (د): الخلايا الأخذة بالتمايز ملتصقة في قاع بئر الاستنبات والנסيلة معلقة في الوسط المغذي تكبير 200X. (هـ): شكل الخلايا المتمايزة المستتبة في وسط مدعم بـ 25% مصلي بشري تكبير 400X تحت المجهر المقلوب. (و): شكل الخلايا المتمايزة والمستتبة في وسط مدعم بـ 12.5% مصلي بشري + 12.5% مصلي بقري تكبير 200X تحت المجهر المقلوب. (ن): شكل الخلايا المتمايزة المستتبة في وسط مدعم بـ 25% مصلي جنين البقر تكبير 400X تحت المجهر المقلوب. (ط): مشهد لانقسام خلية متمايزة في وسط الاستنبات تكبير 400X تحت المجهر المقلوب. (ي): منظر للأشلاء الخلوية وبقايا الخلايا المستتبة في الوسط غير المدعم بأي من عوامل النمو أو الأمصال المغذية تكبير 200 X تحت المجهر المقلوب.

4-6-2. تقييم الفعالية الوظيفية للخلايا المتميزة (البالعات الكبيرة)

كما كان لطريقة انتقاء الخلايا CD34 أثراً على كل من: مردود الخلايا CD34، النقاوة، الحيوية، المرتسم المناعي للعزلة وخاصة النمط الخلوي $CD34^+ CD38^-$ ، كان لها أيضاً أثراً هاماً في سرعة تمايز الخلايا واستجابتها لعوامل النمو، وقد سجلت جميع هذه المتغيرات فروقات معنوية لصالح طريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي السالب مقابل طريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي الموجب. فقد حققت الخلايا الجذعية (المعزولة بطريقة الانتقاء السالب) التمايز بسرعة أكبر لم يتجاوز 21 يوم استتبات في حين أن الخلايا الجذعية $CD34^+$ (المعزولة بطريقة الانتقاء الموجب) تجاوزت هذه المدة حتى اليوم 35 من الاستتبات وهذه النتيجة اتفقت مع نتائج العزل والتميط التي أشارت إلى أن النمط الخلوي $CD43^+ CD38^-$ هو النمط الأقل تقييداً والذي تَمَتَّع بصفات شبه جنينية سمحت له بالاستجابة لعوامل الانقسام والنمو بشكل أسرع.

فرغم أنَّ التتميط المورفولوجي للخلايا بيّن أنها قد تمايزت وتخصصت وظيفياً. إلى جانب أن الخلايا المعزولة بكلا الطريقتين والمستتبتة في الشروط النوعية للتمايز باتجاه بالعات أبدت تعبيراً واضحاً للمستضدات السطحية المسؤولة عن التمايز تجاه وحيدات وبالعات خلال الأسبوع الثاني من الاستتبات كما هو موضح في الشكل (4-31) لتتبع التعبير عن المستضد CD14 الأساسي في تمايز الخلايا تجاه خط وحيدات-بالعات، إلا أن هذا التمايز هو تمايز شكلي وبنوي فقط لم يتعدى مرحلة التمايز الوظيفي الأمر الذي تم توثيقه عن طريق خمج الخلايا بطفيلي اللشمانيا (للتأكد من أن الخلايا قادرة على بلعمة الطفيلي) وعن طريق قياس شدة الأكسدة الحاصلة ضمن الجسيمات الحالة في الخلايا المتميزة (للتأكد من قدرة الخلايا على إنتاج وسائط استقلاب تتفاعل مع الأوكسجين وتعكس النشاط الأنزيمي ضمن الخلايا المتميزة لقتل البكتريا) خلال فترات زمنية مختلفة من الاستتبات في وسط التمايز فدراسة كل من وظيفة البلعمة والأكسدة لم تتحقق حتى اليوم 21 من استتبات الخلايا CD34 المعزولة بطريقة الانتقاء السالب وحتى اليوم 35 من استتبات الخلايا CD34 المعزولة بطريقة الانتقاء الموجب. وهذه النتيجة دعت إلى ضرورة الكشف عن أحد وظائف الخلايا على الأقل بعد تمايزها مورفولوجياً للتأكد من كفاءة التمايز وعدم وجود خلل وظيفي.



الشكل (4-31): استجابة الخلايا الأكثر بدئية المعزولة بطريقة الانتقاء السلبي وتعبيرها عن المستضد CD14 بشكل أكبر من الخلايا المعزولة بطريقة الانتقاء الإيجابي.

4-6-2-1. تقييم شدة الإخماج بطفيلي اللشمانيا

تم حضان الخلايا الجذعية المستتبنة مع طفيلي اللشمانيا عند أيام الاستنبات (0-5-7-14-21-35) لتقييم الفعالية الوظيفية للخلايا والتأكد من تمايزها كما ذكر في الفقرة (3-10)، غاب فيها النشاط البلعمي للخلايا حتى ظهر قبيل اليوم 35 من الاستنبات بالنسبة للخلايا المعزولة بالطريقة الإيجابية، وحتى اليوم 21 من الاستنبات بالنسبة للخلايا المعزولة بالطريقة السلبية، مما دلّ على أن الخلايا المعزولة بالطريقة السلبية هي خلايا أكثر بدئية استجابت لعوامل التمايز بصورة أكبر وحققت تمايزها خلال مدة زمنية أقل بالمقارنة مع نظيرتها المعزولة بالطريقة الإيجابية.

ووجد أنّ نسبة من الخلايا قد حققت التمايز الوظيفي وكانت قادرة على البلعمة رغم أنها استتبنت في وسط خال من عوامل الانقسام والتمايز الشكل (4-32)، كانت 17% للخلايا المعزولة بالطريقة السلبية و14.66% للخلايا المعزولة بالطريقة الإيجابية، كما بلغت الشدة الإخماجية فيهما 2.02 ± 0.02 ، 2.53 ± 0.01 على التوالي بفرق معنوي $p > 0.05$ لصالح الخلايا المعزولة بالطريقة السلبية الجدول (4-5).

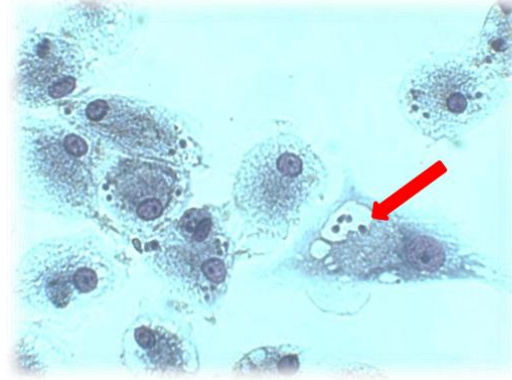
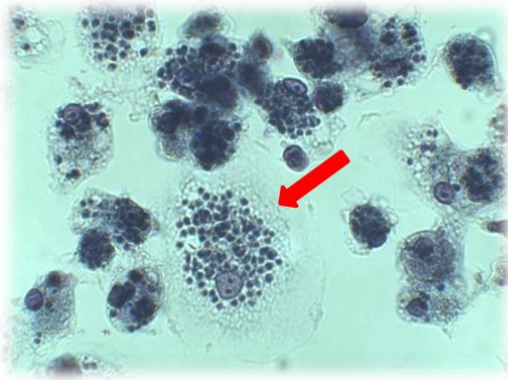
وسُجّلت نسب مئوية أعلى لكل من الخمج الخلوي والشدة الإخماجية في الأوساط المدعمة بعوامل النمو والانقسام بالإضافة إلى المصل البشري أو مصل جنين البقر أو كلا المصلين بفرق معنوية $p > 0.05$ بالمقارنة مع الوسط غير المدعم كما هو موضح في الجدول (4-5)، ولوحظ أن الوسط المدعم بالعوامل (IL3، IL-6، SCF، Flt3-، M-CSF، ligand) و12.5% مصل بشري + 12.5% مصل جنين بقر هو الوسط الأمثل للتحريض على التمايز

الوظيفي للخلايا وحيدات-بالعات كبيرة، فقد حقق النسب الأعلى لكل من النسبة المئوية للخمج وكذلك الشدة الإخماجية على اختلاف طريقة عزل الخلايا.

أ: قبل الإخماج (خلايا متميزة)



ج: بعد الإخماج (خلايا بدون عوامل النمو والتمايز) ب: بعد الإخماج (خلايا بوجود عوامل النمو والتمايز)



الشكل (4-32): (أ): الخلايا المتميزة مثبتة وملونة بملون غيمزا وغير مخموجة بطفيلي اللشمانيا. (ب): خلايا متميزة معالجة بعوامل النمو والتمايز يبدو ضمنها طفيلي اللشمانيا في طور الـ Amastigote ويعد كبير بالمقارنة مع الخلايا في الشكل (ج): المتميزة وبداخلها الطفيلي لكن بعدد أقل ضمن الجسم الحال، الخلايا مثبتة وملونة بملون غيمزا تحت المجهر المقلوب تكبير X400.

الجدول (4-5): النسب المئوية للخمج والشدة الإجمالية للخلايا المعزولة بكلا طريقتي الانتقاء السلبي والإيجابي.

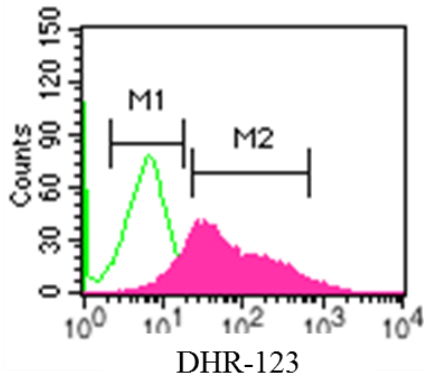
طريقة العزل	القياس	12.5% بشري+ 12.5% بقري	مصل جنين البقر %25	مصل بشري 25%	الشاهد غير المعالج
الانتقاء السلبي	النسبة المئوية للخمج	98.33% ± 1.01	%86 ± 0.99	%81 ± 1.01	%17±1
	الشدة الإجمالية	3.02 ± 0.01	1.94 ± 0.00	2.01 ± 0.01	2.53 ± 0.01
الانتقاء الإيجابي	النسبة المئوية للخمج	%98 ± 1.01	%82.66 ± 0.99	%74.33 ± 0.99	%14.66 ± 1
	الشدة الإجمالية	2.64 ± 0.03	1.11 ± 0.01	1.84 ± 0.04	2.02 ± 0.02
P	النسبة المئوية للخمج	0.70	0.01	0.001	1.75
	الشدة الإجمالية	0.000	0.000	0.000	0.000

4-2-6-2. قياس شدة الأوكسدة ضمن الجسيمات الحالة

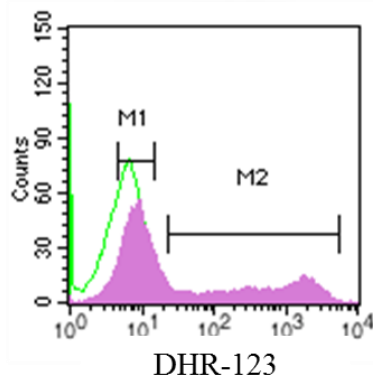
تمّ قياس الشدة التأكسدية للخلايا الجذعية المستتبّة عند أيام الاستنابات (0-5-7-14-21-35) لتقييم الفعالية الوظيفية للخلايا والتأكد من تمايزها كما ذكر في الفقرة (3-11)، غاب فيها النشاط الأنزيمي للخلايا حتى اليوم 35 بالنسبة للخلايا المعزولة بالطريقة الإيجابية، وحتى اليوم 21 من الاستنابات بالنسبة للخلايا المعزولة بالطريقة السلبية، مما دلّ على أن الخلايا المعزولة بالطريقة السلبية هي خلايا أكثر بدئية استجابت لعوامل التمايز بصورة أكبر وحققت تمايزها خلال مدة زمنية أقل بالمقارنة مع نظيرتها المعزولة بالطريقة الإيجابية.

وكما في تقييم الخلايا بواسطة الخمج بطفيلي اللشمانيا، وُجِدَ أنَّ نسبة من الخلايا قد حققت التمايز الوظيفي وسجّلت نشاطاً أنزيمياً رغم أنها استنبتت في وسط خال من عوامل الانقسام والتمايز كان شبه مهمل في كلتا حالتَي الخلايا المعزولة بالطريقة السلبية والخلايا المعزولة بالطريقة الإيجابية، أما بالنسبة للخلايا المُحرّضة بواسطة البكتريا E.coli أو المُحرّض الفزيولوجي FMLP أو PMA فقد قيسَت شدّات الأكسدة على اختلاف نوع المُحرّض وسجّلت قيماً بفرق معنوي $p > 0.05$ بالنسبة للشاهد السليبي (الخلايا المعالجة وغير المُحرّضة) أهمّها كان النّشاط التأكسدي للخلايا المستنبتة في الوسط المُدعّم بكلا المصلين البشري والبقري بنسب متساوية 12.5% وكذلك بفرق معنوي بالنسبة لباقي الأوساط الجدول (4-6) كما كانت شدات الأكسدة أعلى وبفرق معنوي أيضاً لصالح الخلايا المعزولة بالطريقة السلبية الجدول (4-6) والشكل (4-33).

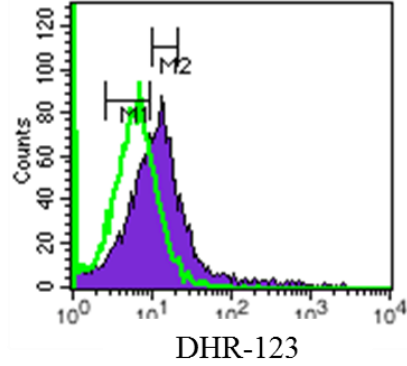
(أ): E. Coli



(ب): FMLP



(ج): PMA



الخلايا غير المحرّضة (أخضر)
الخلايا المحرّضة (أرجواني)

الشكل (4-33): تمثيلات هستوغرام تعبر عن الشدة التأكسدية للخلايا المحرّضة بكل من المحرّضات E.coli و FMLP و PMA بالمطابقة مع الشاهد السليبي (الخلايا دون إضافة عوامل النمو والتمايز وغير محرّضة). الانزياح في هذه المخططات عن الشاهد السليبي يشير إلى دور عوامل النمو والتمايز في الفعالية الوظيفية للخلايا المتمايزة تجاه بالعات كبيرة.

الجدول (4-6): النسبة المئوية لتقلور المداد ديهيدرورودامين الذي يعكس الشدة التأكسدية والنشاط الأنزيمي في الجسيمات الحالة للخلايا المتمايزة.

الاختبار	بشري +12.5% مصل بقرى	25% مصل جنين البقر	25% مصل بشري	الشاهد السلبي
الانتقاء السلبى				
بدون تفعيل	0.08 ± 0.005	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.00
E.coli	6.55 ± 0.23	3.68 ± 0.01	3.05 ± 0.03	1.09 ± 0.02
FMLP	11.81 ± 0.01	10.86 ± 0.13	10.55 ± 2.13	3.34 ± 0.34
PMA	12.07 ± 0.12	11.83 ± 2.11	11.48 ± 1.55	2.72 ± 0.07
الانتقاء الإيجابى				
بدون تفعيل	0.05 ± 0.004	0.05 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
E.coli	4.45 ± 0.20	3.60 ± 0.12	3. ± 0.01	1.04 ± 0.00
FMLP	10.11 ± 0.01	9.09 ± 0.87	9.85 ± 0.13	1.00 ± 0.00
PMA	10.12 ± 0.01	10.18 ± 0.13	10.13 ± 0.07	1.02 ± 0.01
P	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

المناقشة

DISCUSSION

5- المناقشة Discussion

في ضوء ما توصل إليه باحثون آخرون تطرّقوا لموضوع الدّراسة نفسه، لم يقتصر تفسير حالة عدَم التّجانس في نسب التّعبير عن المستضدات النّوعية على سطح الخلايا الجذعيّة المؤدّة للدّم إلى كونها خلايا قد تكون غير متجانسة Heterogenous فحسب، وإنّما أيضاً إلى حساسيّة طرائق العزل المستعملة والتي تؤثر في عددها وحيويّتها، وبالتالي على تواتر تعويض الجمهرات الخلويّة الدّمويّة في الأفراد التي تتلقّى هذه الخلايا بعد الاغتراس (سلوكها في الكائن الحي) (Rivadeneyra-Espinoza, et al, 2006). وفُدرت الحاجة الدّنيا إلى الخلايا المنوّاة لكل واحد كيلو غرام من وزن الشخص البالغ الموهوب له الطّعم الخلوي بحوالي $(1 \times 10^7 - 2 \times 10^7)$ خلية (Encabo et al; 2003) وذلك لضمان نجاح تعويض المنظومة الدّمويّة والمناعيّة لديه، وفي دراسات أحدث فُدرت بـ (20×10^7) خلية منوّاة لكل واحد كيلوغرام أي ما يعادل (1.7×10^5) خلية جذعية/كيلوغرام من وزن المريض البالغ. (Singh et al; 2009). وللتوصّل إلى مثل هذه الجرعة من الخلايا في ظل عدم كفاية عدد الخلايا الجذعيّة المشتقّة من العيّنة الواحدة من دم الحبل السّري، هدفت العديد من الأبحاث والدّراسات إلى تحسين وتطوير طرائق العزل والإكثار، والمقارنة فيما بينها لتوفير العزلة الأمثل من حيث المردود والنّقاوة وطبيعة النّمط أو الطّابع المناعي المرغوب به في عمليّات الاغتراس عند الكائن الحي.

وفي هذه الدّراسة يبدو أنّ الزّيادة في نسبة التّمط الخلوي $CD34^+CD38^-$ النّاتجة عند تطبيق طريقة الانتقاء السّلبّي مقارنة بطريقة الانتقاء الإيجابي تعود إلى قصر الزمن اللازم لإتمام العزل بالإضافة إلى آليّة ومبدأ هذه الطريقة غير المباشرة في انتقاء الخلايا $CD34^+$ ، (Tuija, et al, 2005).

كما أنّه في معظم الدّراسات السّابقة التي اتّبعَت طريقة العزل الإيجابي انخفض المردود الخلوي إلى حوالي 50% وكذلك الأمر بالنسبة لحيويّة الخلايا، ورَجّحت الأبحاث سبب ذلك إلى زيادة عدد مرّات الغسل أثناء تمرير العيّنة ضمن المغناطيس والتي وصلت إلى عشر مرّات للحصول على نقاوة عالية (Kikaraine, et al, 2006).

ومن ناحية أخرى بيّنت دراسة حديثة أنّ الاختلاف في النّسبة المئويّة للخلايا $CD34^+$ المعزولة يعود إلى مجموعة من العوامل والمعطيات المرتبطة بالأمر (عمرها، وعدد الولادات، وعمر الحمل، وزمرة الدم)، ووليدها (الوزن، والجنس) والتي وُجد أنّ لها أثراً في نسبة الخلايا $CD34^+$ في دم الحبل السّري. وأكدت على

أن تؤخذ هذه العوامل بعين الاعتبار عند معالجة العينة لحفظها في بنوك دم الحبل السري، مما قد يضمن الحصول على عدد أكبر من الخلايا الجذعية والسلائف المبكرة (Azouna, et al, 2011). فقد وُجِدَ أنَّ العدد المطلق والنسبة المئوية للخلايا $CD34^+$ من الخلايا وحيدة النواة MNCs في دم الحبل السري البشري قد تناسباً عكساً مع عمر الحمل (Hao, et al, 2000) وبالتالي فإنَّ هناك العديد من العوامل التي تؤثر على مردود الخلايا وطابعها المناعي.

ويُعتقد أيضاً بأنَّ وجود الخلايا الجذعية في دم الحبل السري متعلّق بعوامل النمو التي تحرّرها خلايا المشيمة وكذلك بتوتّر الأوكسجين المنخفض عند الولادة low oxygen tension، بدليل أنَّ أعداد هذه الخلايا الجذعية في دم الوليد تنخفض كثيراً بعد ساعات من الولادة لتصبح ضمن مجال الأعداد الطبيعية الملاحظة لدى البالغين (Roy et al, 2012)

أمّا في ما يتعلّق بتعبير الخلايا الجذعية المؤدّة للدّم عن المستضدّات النوعية الأخرى فُوجِدَ أنَّ الخلايا $CD34^+$ العالية التّعبير عن المستضد $CD117$ هي سلائف للخلايا النّوقية المسؤولة عن توليد الخلايا المحبّبة والبالعات الكبيرة التي تؤدي دوراً هاماً في الاغتراس، بينما اتصفت الخلايا $CD34^+$ منخفضة التّعبير عن المستضد $CD117$ بأنّها سلائف مؤدّة لخلايا الدّم الحمراء، وبذلك يُستفاد من التّعبير عن المستضد $CD117$ كواسمة لتحديد سلائف دم الحبل السري وانتقائها من أجل عمليّات الاغتراس طويلة الأمد. (laver, et al, 1995) بالإضافة إلى أنَّ التّعبير عن المستضد $CD117$ له ارتباط بعمر المتبرع (Mashaliniski, et al, 2006).

وكان النّمط الخلوي $CD34^+ CD38^-$ في دم الحبل السري من الأنماط الخلوية التي تمّ التركيز عليها منذ أوائل الثمانينيات (Belveder, et al, 1999)، إذ لوحظ أنّه كلما كان عدد الخلايا $CD38^-$ في العزلة $CD34^+$ أكبر كلما كان تضاعف الخلايا أعلى، ولم يثبت أن هناك ارتباط بين التّعبير عن $CD34$ مع التّعبير عن المستضدّات $CD117$ و $CD133$ من جهة وزيادة التضاعف الحاصل في عدد الخلايا المستتبنة من جهة أخرى. (Encabo et al; 2003).

ومعظم الدّراسات السّابقة أشارت إلى انخفاض نسبة النّمط الخلوي $CD34^+ CD38^-$ في نُقي العظم بالمقارنة مع دم الحبل السري (Malangone, et al, 2001).

ومن نتائج هذه الدراسة نستطيع القول بأنَّ بالنَّمط $CD34^+ CD38^-$ عبارة عن طلائع أولية تمتلك قدرة عالية على النُّطعيم، الأمر الذي توافَق والحالات السريرية الناجحة لاستعمال دم الحبل السري كمصدر للغرسة حتى في الحالات التي اغترس فيها عدد قليل من الخلايا، وذلك لقدرتها على التكاثر وبسرعة كبيرة بالمقارنة مع تلك الموجودة في نُقي العظم (Wisniewiske, et al 2011). وكذلك الأمر في دراسة حديثة اتبعت طريقتين مختلفتين لعزل النَّمطين $CD34^+ CD38^-$ والنَّمط $CD34^+ CD38^+$ ، حيث خُلصت إلى أنَّه وبغض النَّظر عن طريقة العزل المتَّبعة (الانتقاء المناعي السَّلبي أو باستخدام الفارز (Sorter) فإن الخلايا $CD34^+ CD38^-$ هي التي حَقَّقت زيادة معنوية في حركية الانقسام والتوسُّع النَّسيلي بالنسبة لكل من الخلايا الجذعية $CD34^+$ والنَّسائل المكوِّنة للدم (CFU) colony-forming cells والخلايا ذات القدرة طويلة الأمد على الاستنبات (LTC-IC) long term culture-initiating cells (Guzman et al; 2013)

وبات من المتعارف عليه أنَّ الخلايا الجذعية $CD34^+$ في دم الحبل السري البشري تُعبَّر بشكل أساسي عن المستضد CD33 وبالذات الخلايا من النَّمط $CD34^+ CD38^-$ وهذا النَّمط أُشير إليه في بعض الدِّراسات بكونه يتميَّز بقدرة أعلى على الانقسام والاستجابة لعوامل النُّمو بالمقارنة مع النَّمط $CD34^+$ الذي مصدره نقي العظم وبالتالي فإنَّ النَّمط الخلوي $CD33^+ CD43^+$ هو جمهرة أساسية في خلايا دم الحبل السري، ولا يُعبَّر عن الخط النَّقوي النَّاضج للسلائف النَّقوية فقط كما هو متعارف عليه في نقي العظم ولزِّمًا كان هذا النَّمط يُمثِّل سلائف بدئية كذلك الموجودة في كبد الجنين (Hao, et al, 2000)

وفي الخلايا الجذعية الجنينية المستنبطة في الرَّجاج وُجد أنَّ التَّعبير عن المستقبل CD105 مرتبط بتمايز الخلايا من النَّمط $CD45^-$ إلى النَّمط $CD45^+$ ، الأمر الذي أشار إلى الدور الهام له في تطوُّر ونمو الخطوط الخلوية الدَّموية بدءاً من سلائفها (Cho, et al, 2001)

ويُعدَّ المستضد CD105 مستقبل للعامل $TGF-\beta$ الضَّروري لبقاء الخلايا وحيويتها وموتها المبرمج وعدم نضجها وتمايزها (Fortune, et al, 2003) ممَّا أعطى هذا المستضد أهمية بالغة لعلاقته بتوليد الدَّم وتجديده.

ورغم أنَّ بعض الدِّراسات القديمة والحديثة أشارت إلى أنَّ السلائف المبكرة جداً في دم الحبل السري هي من النَّمط $CD34^+ HLA-DR^+$ (Traycoff, et al, 1994)، إلا أنَّ النسبة العالية من النَّمط $CD34^+ HLA-DR^-$ في هذه الدِّراسة اتَّفقت مع ما لُوَّحظ من قِبَل العديد من الباحثين فانخفاض التَّعبير

عن المستضد HLA-DR وبشدة على سطوح الخلايا CD34⁺ التي مصدرها دم الحبل السري هو ميزة تعني أنّ ردود الفعل المناعية تجاه الغرسة ستكون في حدودها الدنيا في حين أنّ التعبير عنه يميّز الخلايا الأكثر تمايزاً (Fasouliotis & Schenker, 2000)

وخلّصت الدراسات إلى أنّ ارتباط العامل انتروكين -3 مع المستضد السطحي CD-123 يحفّز السبيل الإشاري المسؤول عن حيوية وانقسام الخلايا وتوسّعها النسيلى (Jin, et al,2009). الأمر الذي اتفقت معه نتائج هذه الدراسة بارتفاع التعبير عن المستضد CD123 على سطوح الخلايا CD34⁺ وانخفاض التعبير عنه خلال مراحل التمايز اللاحقة، حيث ساهمت إضافة العامل IL-3 إلى وسط الاستنبات في الحفاظ على حيوية الخلايا واستمراريتها بالمقارنة مع عينات استنبات الشاهد السلبى الذي افتقد إلى العامل IL-3 وتراجع فيها كلّ من حيوية الخلايا ومعدل انقسامها.

وحديثاً اهتمت العديد من الدراسات بمقارنة الطابع المناعي للخلايا الجذعية المؤدّة للدم بحسب مصدرها وأثبتت وجود فروقات في طبيعة التعبير عن بعض الواسمات السطحية ونسب تحت المجموعات السلفية، وعلاقتها بالاختلافات المتعلقة بقدرة الخلايا على التضاعف والتمايز، واستمراريتها في وسط الاستنبات وغير ذلك، والذي انعكس بدوره على التطبيقات السريرية للعلاج الخلوي والجيني باستعمال الخلايا الجذعية المؤدّة للدم (De Smedt et al., 2011; Liu et al., 2011; Ngoma et al., 2011).

كما قام Broxmeyer وزملاؤه بتقييم استعمال خلايا دم الحبل السري في معالجة البالغين ومع أنّ أعداد الخلايا المنوأة أقل بكثير من تلك التي تحتويها غرائس النقي فإنّ هذه الخلايا المؤدّة في دم الحبل السري كانت لها قدرة أكبر وأعلى على التضاعف والتوسّع النسيلى في الزراعات السائلة قصيرة الأجل (Broxmeyer et al., 1992b).

وبيّنت العديد من الدراسات أنّ الأمر قد يعود إلى أنّ التيلوميرات في الخلايا الجذعية المؤدّة للدم المعزولة من دم الحبل السري أطول بالمقارنة مع تيلوميرات الخلايا في نقي العظم وبذلك امتلكت القدرة على البقاء لمدة أطول في وسط الاستنبات (Schuller et al., 2007; Zimmermann et al., 2004).

وعلى الصعيد التطبيقي والسريري لأحد أهم البروتوكولات العالمية (بروتوكول الجمعية الدولية للمعالجة بالدم وهندسة الغرائس ISHAGE) الذي أخذ بعين الاعتبار مجموعة واسعة من العوامل التي لها أثر على الخلايا أثناء التعامل معها ابتداءً من نوع العينة وشروط التخزين ونوع مانع التخثر ونوع نسيلة ضد CD34

وتراكيذه المستخدمة بالإضافة إلى نوع المحلول الحال. وكذلك إعدادات جهاز قياس الجريان الخلوي وتحديداً معدّل التدفق وعتبة قذح القياسات ومعيار جمع البيانات وضبط حدود القطاعات وبوابات التحليل (Whitby, et al, 2012)، مُلخّصاً بذلك أهميّة ما آلت إليه الأبحاث قديماً وحديثاً ودورها في التوصل لتطبيق سريري ناجح. وخلال العشرين سنة الأخيرة ومع استمرار الأبحاث تمّ التعرف على جمهرات خلويّة نادرة ومنخفضة في دم الحبل السري، إلاّ أنّها أيضاً أكثر نوعيّة في العلاج الخلوي على اعتبارها أكثر بدنيّة وأقرب للحالة الجنينية. وكمثال عنها الجمهرة الخلويّة $CD34^+CD33^-CD13^+$ التي وُصفت على أنّها خلايا جذعيّة أكثر بدنيّة من الخلايا التي تعبّر عن المستضد CD33 وبأنّ المستضد CD13 يسبق المستضد CD33 في التعبير في مرحلة من مراحل تكوّن الدّم، على اعتبار أنّ الخلايا $CD34^+$ متغايرة في بناء خطوطها الخلويّة وفي درجة نضجها، والتفتت هذه الأبحاث إلى الاختلافات الواردة باختلاف مصدر هذه الخلايا وبذلت العديد من المفاهيم الشائعة عن الخلايا الجذعيّة المؤدّة للدّم التي مصدرها دم الحبل السري (Gaipa et al; 2002).

وبالنسبة لنتائج استنبات الخلايا $CD34^+$ ، فلم يتوقف البحث عن نظم واستراتيجيات استنبات مختلفة لإكثار الخلايا الجذعيّة المعزولة من دم الحبل السري في الرّجّاج، من خلال محاولات لتقليد البيئة الميكروبيّة المحيطة بالخلايا الجذعيّة بدءاً من التعرف على دور السيتوكينات وعوامل النّمو المختلفة، إلى استنبات الخلايا الجذعيّة إلى جانب خلايا مساعدة مغذّية Feeder layer وكذلك تحديد أثر الأمصال الغنيّة بالمواد المغذّية الضّروريّة لبقاء واستمراريّة الخلايا كمحاولة لتصميم الوسط المغذّي الأمثل لإكثار الخلايا الجذعيّة دون فقدان خصائصها الجذعيّة Stemness أو تمايزها والحد من الخلايا الآخذة بالتموّت التي ستحرر سيتوكينات تحريضية أو كيموكينات تموّت تؤثر على بقيا الخلايا المجاورة (Nicolau et al; 2004)، ويحتل كلّ من اختيار الوسط المناسب ونظام الاستنبات المرتبة الثانية في الحفاظ على الخلايا ونموّها بعد اختيار طريقة العزل كخطوة أوليّة، فالوسط المغذّي يتضمّن مواد دائرة تضمن توازن حلويّة الوسط ودرجة الـ pH. ومن الأوساط الأكثر رواجاً وقليلة التكلفة وسط الـ IMDM المعدّل عن وسط DMEM لاحتوائه على حموض أمينيّة وفيتامينات ومادة السيلينيوم، كما أنّ هناك أوساطاً جديدة مهيّئة لأنماط خلويّة محدّدة تتميّز باحتوائها على عوامل نمو إضافيّة مثل السيتوكينات المحرّضة على الانقسام والتّمايز كما هو الحال في هذه الدّراسة حيث أُستنبتت الخلايا في وسط نوعي للخلايا الجذعيّة المؤدّة للدّم Stem line II الذي دُعّم بعوامل هي من أكثر العوامل الشائعة الاستخدام في استنبات الخلايا الجذعيّة المؤدّة للدّم SCF،

IL-3، IL-6، FLT-3 Ligand. حيث ساهم هذه المزيج من العوامل في تكثير الخلايا بعد مرورها بطور النُّبَاطُ Lag Phase الذي مرَّت به الخلايا خلال الأيام الأولى من الاستنابات (حتَّى اليوم الخامس) ثمَّ انطلقت الخلايا بعده وأغنت أطباق الزرع.

كما أنَّ لنوع ومصدر المصل المضاف لوسط الاستنابات أهميةً بالغة إذ أنَّه يحتوي على أكثر من 1000 مادةً مختلفة وهي عموماً غير معلومة التراكيز بشكل دقيق، ووُصِّفت على أنَّها مواد طبيعية غير مُعرَّفة أو مُستقرَّة، لا تزال قيد الدِّراسة والتجريب، وكثيراً ما ينجم عن عدم المعرفة الكاملة لمحتوى الأمصال حالة من ضعف السيطرة على ظروف الاستنابات وإمكانية تفسير نتائجه بدقَّة، لذلك ساهمت النتائج في هذه الدِّراسة في إعطاء فكرة عن أثر كل من المصل البشري HS ومصل جنين البقر FBS على الخلايا الجذعية المولدة للدم. و تسعى الأبحاث مؤخراً إلى تصميم أوساط خالية من الأمصال لما قد تؤدي إليه من انتقال بروتينات غير بشرية، أو تصميم أوساط مُدعَّمة بأمصال بشرية مصدرها دم الحبل السري والمشيمة (Revenu et al; 2013 & Koestenbauer et al; 2009).

وتوجَّه العديد من الأبحاث نحو الاهتمام بالطريقة الوحيدة المعتمدة لحفظ الخلايا الجذعية المولدة للدم (Cryopreservation) فرغم أنَّ هذه التقنية مفيدة في حفظ الخلايا ولفترات زمنية طويلة إلاَّ أنَّها تتسبب بأذية للخلايا تختزل من حيويَّتها بعد إزالة التجميد بسبب ما تتعرَّض له من فروقات في حالة الكثافة الحلولية وتشكُّل الكريستالات ضمن الخليَّة (Konservierung et al; 2011 & Son et al; 2010)، بالإضافة إلى الأثر السمي لوسط الـ DMSO، وهذا فسَّر انخفاض حيوية الخلايا المُجمَّدة في هذه الدِّراسة وتراجع أعداد الخلايا المستتبتة خلال الزرع. ومع ذلك فإنَّ اللجوء إلى العينات المجمَّدة هو خطوة انتقائية عند الضرورة لأنَّ الخلايا السليمة والتمتَّعة بكفاءة وقُدرة ممتازة على التكاثر هي التي سوف تبقى حيةً ومستمرَّة. ومثل هذه النتائج دعت الباحثين والعاملين في هذا المجال إلى البحث عن بدائل لوسط الـ DMSO مثل Trehalose و Sucrose التي افترضَ بأنَّها ذات أثر سمي أقل على الخلايا عندما تجمد (Skorice et al; 2007 & Rodrigues et al; 2008). وكانت قد اتَّفقت ما توصَّلت إليه نتائج هذا البحث مع أحد الدِّراسات من حيث مساهمة العامل IL-6 في صَوْن الحالة الجذعية للخلايا المُستتبتة. فلدَى استنابات الخلايا CD34⁺ المعزولة من دم الحبل السري في الرَّجَّاج، وُجد أنَّ العامل إنترلوكين - 6 يُنْبِط تمايزها في حال وجود العامل إنترلوكين - 3 المُحفِّز للانقسام، ممَّا أكَّد على أهمية العامل إنترلوكين - 6 في الزَّرعات طويلة الأمد (LTC). وفسَّر هذا الأثر للعامل IL-6 في أنَّ وجوده في وسط الاستنابات إلى جانب

العاملين IL-3 و FLT-3 Ligand يزيد من فعالية التيلومير في الخلايا الجذعية فيحافظ على بقيا هذه الخلايا واستمراريتها (Encabo, et al, 2003).

ويمكن تفسير تراجع كل من الانقسام والحيوية للخلايا المستتبتة في الرُجاج خلال مدّة الاستتبات في هذه الدراسة. بأنّ عملية توليد خلايا الدّم تترافق بتراجع القدرة على التجدد الذاتي Self-renewal capacity للسلائف المؤلّدة Progenitors، بحيث أنّه بعد التخصص الوظيفي، تصبح هذه الخلايا أقل قدرة أو غير قادرة على التضاعف، كما ويقصر عمرها أيضاً (Konuma et al. 2011).

وبفضل الأبحاث التي قارنت الفروقات المتعلقة بنتائج عزل وتتميط واستتبات الخلايا الجذعية على أساس مصدر هذه الخلايا بالدرجة الأولى (Andrade et al; 2011)، تمّ تسليط الضوء على تباين الاختلافات فيما بينها. ففي دراسة للباحث Silva وزملائه وجد أنّ الخلايا الجذعية في دم الحبل السري البشري بدأت بالانقسام أبكر بـ 24 ساعة من الخلايا الجذعية في نقي العظم وكان عدد مرّات الانقسام الخيطي فيها أعلى ويفرق معنوي، وكان من الممكن تتبّعها حتّى الجيل التاسع، في حين أنّ نظيرتها في نقي العظم وصلت حتى الجيل الخامس فقط، كما أنّ جميع الخلايا في عينة دم الحبل السري البشري اجتازت انقسامات خلوية في حين أنّ الخلايا في نقي العظم بقيت منها نسبة 3.8% هاجعة ولم تنقسم. ومن ناحية الطابع المناعي للخلايا انخفض التعبير عن المستضد CD34⁺ في خلايا نقي العظم وبسرعة حتّى قبيل حدوث التوسع النسلي، وتحولت الخلايا فيه من النمط CD34⁺CD38⁻ إلى النمط CD34⁺CD38⁻، أمّا في خلايا دم الحبل السري بقيت الخلايا CD34⁺CD38⁻ مُستمرّة ولمدّة اطول خلال فترة الاستتبات (Silva et al; 2009).

وفي دراسة على الخلايا الجذعية المؤلّدة للدّم مصدرها نقي العظم تمّ الكشف عن نمطين من الخلايا خلال تمايز الخلايا في الرُجاج، خلايا صغيرة بقيت معلّقة في وسط الاستتبات وأخرى أكبر حجماً التصقت بقاع طبق الاستتبات كاللتي لوحظت في هذه الدراسة، كما كان كل من النمطين الخلويين قد عبّرا عن المستضدات السطحية المميزة للخلايا الوحيدات والبالعات الكبيرة النّاضجة التي استخدمت في هذه الدراسة عند تتبّع تمايز الخلايا المستتبتة في الأوساط المُحرّضة للتمايز بالإضافة إلى المستضد العلام CD206 الذي وجدت الدراسات أنّ الخلايا الملتصقة فقط هي التي عبّرت عنه دون الخلايا التي بقيت معلّقة في وسط الاستتبات، كما بدا أنّ عامل زمن استتبات الخلايا الجذعية المُحرّضة على التمايز أعطى فكرة عن نشاطها

الوظيفي المرتبط بإفرازها للسيتوكينات فالخلايا المستتبتة لمدة ثلاثة أسابيع تفرز العامل IL-8 بمستويات منخفضة وبصورة تلقائية وغابت الأنماط الأخرى من السيتوكينات، في حين أنّ الخلايا ذاتها والمستتبتة لمدة خمسة أسابيع تقريباً كانت قادرة على إفراز كل من العوامل IL-8 وIL-6 ومثل هذه الدراسات تعطينا فكرة عن التحليل الوظيفي للبالعات الكبيرة والوحدات المستتبتة في الزجاج (Suzuki K et al; 2007).

وفي النهاية فإنّ مثل هذه الدراسة في الزجاج *In Vitro* تُعدّ منطلقاً أساسياً لدراسة لاحقة تتم في الكائن الحي *In Vivo*، كما نجد أنّ التآثر المتبادل بين العوامل الخارجية والعوامل الداخلية لا يزال غير واضح ولسوف يكون من الصعب الإلمام بكل ما يخص إكثار وتمايز الخلايا الجذعية المؤلدة للدم ريثما تتم دراسة السبل الإشارية الداخل خلوية والخارج خلوية التي تضبط بدورها وتتحكم بمصير هذه الخلايا.

الاستنتاجات

CONCLUSIONS

6- الإستنتاجات Conclusions

1- تمكنت هذه الدراسة من عزل وتنميط الخلايا الجذعية المولدة للدم والتي كانت فيها الخلايا ذات النمط المناعي ($CD45^{-bright}$ $CD34^{bright}$ $CD38^{dim/-}$ $HLA-DR^{dim/-}$ $CD33^{+}$ $CD117^{+}$ $CD123^{+}$)، وهذا يعني أنه تم الحصول على خلايا جذعية حقيقية Real Stem Cells غاب فيها التعبير عن المستضدات المميزة لخط خلوي مُحدّد، وكذلك تمكّننا من الحصول على خلايا عبّرت عن المستضدات المميزة للطلائع الأولى للخط النقوي والتي تفيد في الزّراعات طويلة الأمد وقصيرة الأمد.

2- كان لطريقة انتقاء الخلايا $CD34^{+}$ أثراً على مجموعة من المتغيّرات (عدد الخلايا، حيوية الخلايا، النمط المناعي للخلايا) الهامّة في مجال استنبات الخلايا الجذعية المولدة للدم في الزّجاج والمفيدة في الزّراعات طويلة الأمد وقصيرة الأمد ضمن الكائن الحي، وطريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبّي هي الطريقة الأفضل لعزل الخلايا التي تفيد في الحصول على مردود خلوي مرتفع وبنقاوة وحيوية عاليين كما تساهم وبشكل كبير في سرعة تكاثر الخلايا وتمايزها.

3- كان الوسط Stem Line II المدعّم بالعوامل (IL-3، SCF، و FLT3-ligand) ومصل جنين البقر FBS الوسط الأمثل لتكاثر الخلايا الجذعية المولدة للدم البشريّة خارج الكائن الحي، وكانت الخلايا فيه قادرة على الانقسام والتّجديد الذاتي لفترات طويلة وحافظت على قدرتها متعددة الإمكان، وبالتالي التوصل إلى إمكانية حفظ عينات قابلة للاستعمال في الدّراسات البحثيّة الأساسيّة على الخلايا المولدة للدمّ طويلة الأمد والفعّالة في عمليّات الاغتراس.

4- وكان الوسط Stem Line II المدعّم بالعوامل (IL-3، SCF، FLT3-ligand، IL-6، M-CSF) وكلا نوعي المصلين البشري HS والبقري FBS الوسط المناسب لإكثار وتوجيه تمايز الخلايا نحو الخط الخلوي النقوي وحيدات/ بالعات كبيرة الهام في أبحاث المناعة الطبيعيّة والمناعة المكتسبة، وسلّط الضّوء على أهميّة دراسة بعض وظائف الخلايا المتمايزة للتأكّد من نضجها وسلامتها والاستفادة منها في الزّراعات قصيرة الأمد.

5- تجميد الخلايا $CD34^{+}$ أدى إلى انخفاض حيويّتها بعد إزالة التجميد ورغم ذلك تمّ التأكّد من كفاءتها بعد استنباتها في أوساط ساهمت في إكثارها وتحريض تمايزها كما هو في الخلايا الطازجة غير المجمّدة.

التوصيات

RECOMMENDATION

7. التوصيات Accommodations

آخذين بعين الاعتبار النتائج التي حصلنا عليها بالدراسة التي أجريناها على الخلايا الجذعية المولدة للدم المعزولة من دم الحبل السري البشري، نوصي بأن يتم في الدراسات اللاحقة العمل على:

1- تطبيق طريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي السلبي عند عزل الخلايا الجذعية من النمط $CD34^+CD38^-$ لفعالية هذه الطريقة وسرعتها وملائمتها لغرض استنبات الخلايا.

2- استثمار طريقة الانتقاء المغناطيسي المناعي الإيجابي المعدلة في هذه الدراسة لغرض عزل الخلايا $CD34^+$ ودراستها وذلك لأهميتها في التطبيقات السريرية المعتمدة على العزل المباشر والإيجابي للخلايا $CD34^+$.

3- استمرار البحث عن الفروقات الأساسية التي دعت إلى اختلاف النتائج بين طريقتي العزل الإيجابية والسلبية على الصعيد الجزيئي للخلايا (DNA و RNA) ، مما قد يتيح الفرصة إلى أمثلة شروط عزل الخلايا والاستفادة من إمكاناتها قدر المستطاع.

4- ننصح بتدعيم وسط إكثار الخلايا الجذعية المولدة للدم بمصل جنين البقر FBS، مع الاستمرار بتوسيع البحث عن وسط مناسب لإكثار الخلايا الجذعية دون تمايزها كالأوساط الخالية من الأمصال أو المتضمنة مصل دم الحبل السري البشري.

5- إضافة العامل IL-6 إلى وسط استنبات الخلايا الجذعية المولدة للدم للحفاظ على التعبير عن مستضاداتها الجذعية.

6- إضافة العوامل IL-3 و SCF و FLT3 ligand عند استنبات الخلايا الجذعية المولدة للدم للحفاظ على حيويتها واستمرارية انقسامها.

7- استنبات الخلايا الجذعية المولدة للدم في الوسط المدعم بالعوامل IL-3، IL-6، SCF، M-CSF، FLT3-ligand وكلا المصلين البشري HS والبقر FBS عند توجيه تمايزها نحو خط وحيدات/ بالعات كبيرة.

8- ضرورة قياس المعايير الوظيفية (واحدة منها على الأقل) عند تحريض تمايز الخلايا الجذعية نحو نمط خلوي محدد للتأكد من سلامة أداء الخلية وتمايزها.

9- استمرار توصيف Characterization تحت صفوف Sub-Population الوحيدات وتمايزها نحو بالعات كبيرة، الضروري للعلاج التعويضي للوحيدات في بعض الأمراض التي تكبح تمايز بالإضافة الى دورها في العلاج الجيني Gene Theraby.

10- ننصح بتطبيق طريقة التجميد المتبعة في هذه الدراسة مع الاستمرار بالبحث عن الوسط الأمثل لتجميد الخلايا الجذعية وتجريب أوساط مختلفة حديثة قد تكون أقل سمية مثل Trehalose و Sucrose .

المراجع

REFERENCES

References المراجع الأجنبية-8

1. Abdulrazzak, H., De Coppi, P., and Guillot, P.V. (2013). Therapeutic potential of amniotic fluid stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 8, 117-124.
2. Andrade Pedroz. et al. (2011). Initial CD34+ Cell-Enrichment of Cord Blood Determines Hematopoietic Stem/Progenitor cell Yield Up on Ex Vivo Expansion. *Journal of Cellular Biochemistry* 112: 1822-1831
3. Antoniewicz-Papis, J., Lachert, E., Wozniak, J., Janik, K., and Letowska, M. (2013). Methods of freezing cord blood hematopoietic stem cells. *Transfusion*.
4. Atala, A. (2012). Tissue engineering of reproductive tissues and organs. *Fertil Steril* 98, 21-29.
5. Barker JN. Et al. (2002). Searching for Unrelated donor Hematopoietic Stem Cells: availability and speed of Umbilical Cord Blood Versus Bone Marrow. *Bio Blood Marrow Transplant*, 8: 257-260.
6. Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
7. Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M.L., Donini, A., Dorotea, L., Tonutti, E., Rinaldi, C., Pittino, M., Bacarani, M., *et al.* (1999). Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells Mol Dis* 25, 141-146.
8. Bojanic, I., Cepulic, B.G., and Mazic, S. (2009). [Collection of hematopoietic progenitor cells from healthy donors]. *Acta Med Croatica* 63, 237-244.
9. Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Yoder, M., and Hangoc, G. (1992a). Human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 177, 195-204.
10. Broxmeyer, H.E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R.C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., *et al.* (1992b). Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4109-4113.

11. Cardoso, A.A., Li, M.L., Batard, P., Hatzfeld, A., Brown, E.L., Levesque, J.P., Sookdeo, H., Panterne, B., Sansilvestri, P., Clark, S.C., *et al.* (1993). Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8707-8711.
12. Carow, C.E., Hango, G., and Broxmeyer, H.E. (1993). Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: an effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* *81*, 942-949.
13. Clapp, D.W., Baley, J.E., and Gerson, S.L. (1989). Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants. *J Lab Clin Med* *113*, 422-427.
14. Colpitts, S.L., Stonier, S.W., Stoklasek, T.A., Root, S.H., Aguilera, H.L., Schluns, K.S., and Lefrancois, L. (2013). Transcriptional regulation of IL-15 expression during hematopoiesis. *J Immunol* *191*, 3017-3024.
15. Cutler, C., and Ballen, K. (2009). Reduced-intensity conditioning and umbilical cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplant* *44*, 667-671.
16. Daley, G.Q. (2012). The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* *10*, 740-749.
17. Dasgupta, A., Willerford, D.M., and McAfee, S.L. (1996). Methods of stem cell mobilization. *J Infus Chemother* *6*, 12-16.
18. De Smedt, M., Leclercq, G., Vandekerckhove, B., Kerre, T., Taghon, T., and Plum, J. (2011). T-lymphoid differentiation potential measured in vitro is higher in CD34+CD38-/lo hematopoietic stem cells from umbilical cord blood than from bone marrow and is an intrinsic property of the cells. *Haematologica* *96*, 646-654.
19. de Wynter, E.A., Buck, D., Hart, C., Heywood, R., Coutinho, L.H., Clayton, A., Rafferty, J.A., Burt, D., Guenechea, G., Bueren, J.A., *et al.* (1998). CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* *16*, 387-396.
20. Eapen, M., Rocha, V., Sanz, G., Scaradavou, A., Zhang, M.J., Arcese, W., Sirvent, A., Champlin, R.E., Chao, N., Gee, A.P., *et al.* (2010). Effect of graft

- source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 11, 653-660.
21. Ende, M., and Ende, N. (1972). Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon* (1918) 99, 276-280
 22. Encabo Aracli et al. (2003). CD34+CD38- is a good predictive marker of cloning ability and expansion potential of CD34+ cord blood cells. *Transplantation and Cellular engineering*. 43: 383-389.
 23. Encabo Aracli et al. (2003). Interlukin-6 Precludes the Differentiate induced by Interlukin-3 on expansion of CD34+ cells from Cord Blood. *Hematopoietic Stem Cells*. 88 (04): 388-395.
 24. Gaipa Giuseppe et al. (2002). Characterization of CD34+, CD13+ CD33- cells, a rare subset of immature human hematopoietic cells. *Hematologica* 87: 347-356.
 25. Ghen, M.J., Roshan, R., Roshan, R.O., Blyweiss, D.J., Corso, N., Khalili, B., and Zenga, W.T. (2006). Potential clinical applications using stem cells derived from human umbilical cord blood. *Reprod Biomed Online* 13, 562-572.
 26. Glukman E.R. et al. (2001). Results of Unrelated Umbilical Cord Blood Transplant. *Transfuse. Clin. Biol.* 8: 146-541.
 27. Gusman Patricia Flores et al. (2013). Comparative In Vitro analysis of different hematopoietic cell population from human cord blood: In cearsh of the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion. *Hemaphersis*. 53: 668-678.
 28. Habich, A., Jurga, M., Markiewicz, I., Lukomska, B., Bany-Laszewicz, U., and Domanska-Janik, K. (2006). Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro. *Exp Hematol* 34, 914-925.
 29. Hao, Q.L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1995). A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86, 3745-3753.
 30. Hayflick, L. (1980). Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev* 14, 59-79.
 31. Hurlbut, W., and Doerflinger, R. (2004). Can a morally acceptable way be found to obtain embryonic stem cells? *Origins* 34, 429-433.

32. Jaishankar, A., and Vrana, K. (2009). Emerging molecular approaches in stem cell biology. *BioTechniques* 46, 367-371.
33. Jansen, J., Thompson, J.M., Dugan, M.J., Nolan, P., Wiemann, M.C., Birhiray, R., Henslee-Downey, P.J., and Akard, L.P. (2002). Peripheral blood progenitor cell transplantation. *Therapeutic apheresis : official journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis* 6, 5-14.
34. Kim, D.S., Lee, M.W., Noh, Y.H., Jang, M.C., Lee, S.H., Son, M.H., Jung, H.L., Yoo, K.H., Sung, K.W., and Koo, H.H. (2013). Engraftment Efficacy of Human Hematopoietic Stem Cells Transplanted into NOD/SCID Mice Using Two Methods: Intra-Bone Marrow Transplantation of Hematopoietic Stem Cells and Intravenous Co-Transplantation with Mesenchymal Stem Cells. *Acta Haematol* 131.182-179 ,
35. Koestenbauer, S., Zisch, A., Dohr, G., and Zech, N.H. (2009). Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell Transplant* 18, 1059-1068.
36. Konuma, T., Nakamura, S., Miyagi, S., Negishi, M., Chiba, T., Oguro, H., Yuan, J., Mochizuki-Kashio, M., Ichikawa, H., Miyoshi, H., *et al.* (2011). Forced expression of the histone demethylase Fbx10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 39, 697-709 e695.
37. Lansdorp, P.M., Dragowska, W., and Mayani, H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 178, 787-791.
38. Nicolau St. S et al. (2004). The Comparison of Different of Protocols for Expansion of Umbilical-Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. *J. Cell. Mol. Med.* 8: 223-231.
39. Lanza, F., Moretti, S., Papa, S., Malavasi, F., and Castoldi, G. (1994). Report on the Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Boston, November 3-7, 1993. *Haematologica* 79, 374-386.
40. Lapidot, T. (2001). Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci* 938, 83-95.

41. Laughlin, M.J., Barker, J., Bambach, B., Koc, O.N., Rizzieri, D.A., Wagner, J.E., Gerson, S.L., Lazarus, H.M., Cairo, M., Stevens, C.E., *et al.* (2001). Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 344, 1815-1822.
42. Law, P., Ishizawa, L., van de Ven, C., Burgess, J., Hardwick, A., Plunkett, M., Gee, A.P., and Cairo, M. (1993). Immunomagnetic positive selection and colony culture of CD34+ cells from blood. *J Hematother* 2, 247-250.
43. Lewis, I.D., and Verfaillie, C.M. (2000). Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 28, 1087-1095.
44. Liu, M., Yang, S.G., Xing, W., Lu, S.H., Zhao, Q.J., Ren, H.Y., Chi, Y., Ma, F.X., and Han, Z.C. (2011). Comparison of hematopoietic supportive capacity between human fetal and adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 19, 1028-1032.
45. Ngoma, A., Saito, S., Ohto, H., Ikeda, K., Yasuda, H., Kawabata, K., Kanno, T., Kikuta, A., Mochizuki, K., and Nollet, K.E. (2011). CD34+ cell enumeration by flow cytometry: a comparison of systems and methodologies. *Arch Pathol Lab Med* 135, 909-914.
46. Orkin, S.H. (1995). Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 7, 870-877.
47. Parker, G.C., Anastassova-Kristeva, M., Broxmeyer, H.E., Dodge, W.H., Eisenberg, L.M., Gehling, U.M., Guenin, L.M., Huss, R., Moldovan, N.I., Rao, M., *et al.* (2004). Stem cells: shibboleths of development. *Stem Cells Dev* 13, 579-584.
48. Peault, B., and Tavian, M. (2003). Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann N Y Acad Sci* 996, 132-140.
49. Rivadeneyra-Espinoza, L., Perez-Romano, B., Gonzalez-Flores, A., Guzman-Garcia, M.O., Carvajal-Armora, F., and Ruiz-Arguelles, A. (2006). Instrument- and protocol-dependent variation in the enumeration of CD34+ cells by flow cytometry. *Transfusion* 46, 530-536.

50. Revencu Tatraň et al. (2013). Collection, Isolation and Characterization of the Stem Cells of Umbilical Cord Blood. *Rom J Morphol Embryo*, 54: 291-297.
51. Rocha V. W. et al. (2002). Graft versus host- diseases in children who have received a cord blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 342: 1846-1854.
52. Rodrigue J. P et al. (2008). Evaluation of the haloes and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*. 56 (2): 144-151.
53. Rodrigues, M.T., Lee, S.J., Gomes, M.E., Reis, R.L., Atala, A., and Yoo, J.J . (2012) Bilayered constructs aimed at osteochondral strategies: the influence of medium supplements in the osteogenic and chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *Acta Biomater* 8, 2795-2806.
54. Roy, S., Tripathy, M., Mathur, N., Jain, A., and Mukhopadhyay, A. (2012). Hypoxia improves expansion potential of human cord blood-derived hematopoietic stem cells and marrow repopulation efficiency. *Eur J Haematol* 88, 396-405.
55. Saran, S., Tran, D.D., Klebba-Farber, S., Moran-Losada, P., Wiehlmann, L., Koch, A., Chopra, H., Pabst, O., Hoffmann, A., Klopffleisch, R., et al. (2013). THOC5, a member of the mRNA export complex, contributes to processing of a subset of wntless/integrated (Wnt) target mRNAs and integrity of the gut epithelial barrier. *BMC Cell Biol* 14, 51.
56. Schmitz, N., and Barrett, J. (2002). Optimizing engraftment--source and dose of stem cells. *Semin Hematol* 39, 3-14.
57. Schuller, C.E., Jankowski, K., and Mackenzie, K.L. (2007). Telomere length of cord blood-derived CD34(+) progenitors predicts erythroid proliferative potential. *Leukemia* 21, 983-991.
58. Sidney, J., Grey, H.M., Kubo, R.T., and Sette, A. (1996). Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunology today* 17, 261-266.
59. Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *Journal of cellular physiology* 62, 327-336.

60. Sugiyama, D., and Sasaki, T. (2013). Isolation of embryonic hematopoietic niche cells by flow cytometry and laser capture microdissection. *Methods Mol Biol* 1035, 57-65.
61. Silva Clausia Lobato AD. Et al. (2009). Differences amid bone marrow and cord blood Hematopoietic Stem/progenitor Cell Division Kinetics. *J Cell Physiol*; 220 (1): 102-111.
62. Singh Kuljeet et al. (2009). Evaluation of four methods for Processing human cord blood and subsequent study of the expansion of progenitor stem cells isolated using the best method, *Cytotherapy* 11No 6,768-777.
63. Skoric D. et al. (2007). Collection Strategies and Cryopreservation of Umbilical Cord Blood. *Transfus Med.* 17 (2): 107-113.
64. Suzuki K. et al. (2007). Characterization of Monocyte Macrophag- Lineage- Cells Induced from CD34+ Bone Marrow Cells In Vitro. *J Hematol.* 85 (5): 384-389.
65. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
66. Tavian, M., and Peault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 49, 243-250.
67. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
68. Thorsby, E. (2009). A short history of HLA. *Tissue antigens* 74, 101-116.
69. Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* 14, 213-222.
70. Todaro, M., Turdo, A., Bartucci, M., Iovino, F., Dattilo, R., Biffoni, M., Stassi, G., Federici, G., De Maria, R., and Zeuner, A. (2013). Erythropoietin Activates Cell Survival Pathways in Breast Cancer Stem-like Cells to Protect Them from Chemotherapy. *Cancer Res* 73, 6393-6400.
71. Traycoff, C.M., Abboud, M.R., Laver, J., Brandt, J.E., Hoffman, R., Law, P., Ishizawa, L., and Srour, E.F. (1994). Evaluation of the in vitro behavior of

- phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 22, 215-222.
72. Vose, J.M. (2013). Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol* 88, 1082-1088.
 73. Wang ,J., Kimura, T., Asada, R., Harada, S., Yokota, S., Kawamoto, Y., Fujimura, Y., Tsuji, T., Ikehara, S., and Sonoda, Y. (2003). SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 101, 2924-2.931
 74. Wang, J.J., Lai, Q., Wang, Y.B., Pan, H.Y., Jiang, N.H., Yu, C.F., Xu, R.J., Zhao, L., Zhang, W., Dong, F.M., *et al.* (2013). [Research on screening specific biomarkers for pathological diagnosis and differential diagnosis of amniotic fluid embolism and amniotic fluid aspiration]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 42, 467-468.
 75. Weissman, I.L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.
 76. Yahata, T., Ando, K., Sato, T., Miyatake, H., Nakamura, Y., Mugeruma, Y., Kato, S., and Hotta, T. (2003). A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101, 2905-2913.
 77. Younan, P., Kowalski, J ,and Kiem, H.P. (2013). Genetically Modified Hematopoietic Stem Cell Transplantation for HIV-1 Infected Patients: Can we achieve a Cure? *Mol Ther*.
 78. Zhang, K., Liu, R., Yin, G., Li, X., Li, J., and Zhang, J. (2010). Differential cytokine secretion of cultured bone marrow stromal cells from patients with psoriasis and healthy volunteers. *Eur J Dermatol* 20, 49-53.
 79. Zimmermann, S., Glaser, S., Ketteler, R., Waller, C.F., Klingmuller, U., and Martens, U.M. (2004). Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 22, 741-749.
 80. Yu C, Zhang X, Huang Q, Klein M, Goyal RK. High-fidelity DNA histograms in neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Lab Invest*. 2007;87:466–472.

81. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayall BH, Wheelless L, Cox C. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. International Society for Analytical Cytology. *Cytometry*. 1993;14:472–477.
82. Rabinovitch PS, Longton G, Blount PL, Levine DS, Reid BJ. Predictors of progression in Barrett's esophagus III: baseline flow cytometric variables. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:3071–3083.
83. Rabinovitch PS, et al., 2001
84. von Drygalski A, Savatski L, Eastwood D, Klein J, Adamson JW. The rate of marrow recovery and extent of donor engraftment following transplantation of *ex vivo*-expanded bone marrow cells are independently influenced by the cytokines used for expansion. *Stem Cells Dev* 2005; **14**: 564
85. Mohamed AA, Ibrahim AM, El-Masry MW, Mansour IM, Khroshied MA, Gouda HM *et al.* *Ex vivo* expansion of stem cells: defining optimum conditions using various cytokines. *Lab Hematol* 2006; **12**: 86–93. |
86. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Dane A, Gammaitoni L *et al.* Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. *Leukemia* 1998; **12**: 718–727.
87. Lazzari L, Lucchi S, Porretti L, Montemurro T, Giordano R, Lopa R *et al.* Comparison of different serum-free media for *ex vivo* expansion of HPCs from cord blood using thrombopoietin, Flt-3 ligand, IL-6, and IL-11. *Transfusion* 2001; **41**: 718–719. |
88. Lazzari L, Lucchi S, Rebulli P, Porretti L, Puglisi G, Lecchi L *et al.* Long-term expansion and maintenance of cord blood haematopoietic stem cells using thrombopoietin, Flt3-ligand, interleukin (IL)-6 and IL-11 in a serum-free and stroma-free culture system. *Br J Haematol* 2001; **112**: 397–404. |
89. Filip S, Vavrova J, Vokurkova D, Blaha M, Vanasek J. Myeloid differentiation and maturation of SCF+IL-3+IL-11 expanded AC133+/CD34+ cells selected from high-risk breast cancer patients. *Neoplasma* 2000; **47**: 73–80 |

90. Vavrova J, Filip S, Vokurkova D, Blaha M, Vanasek J, Jebavy L. *Ex vivo* expansion CD34⁺/AC133⁺-selected autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) in high-risk breast cancer patients receiving intensive chemotherapy. *Hematol Cell Ther* 1999; **41**: 105–112.
91. Yao CL, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. A systematic strategy to optimize *ex vivo* expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 2004; **32**: 720–727.

ABSTRACT:

The Hematopoietic stem cells isolated from umbilical cord blood is one of the most important major alternative sources for generating precursors of progenitors cells that are used in transplantations. This study aimed to exam the effectiveness of some isolating methods for Hematopoietic stem cells in order to improve the yield and viability of CD34⁺ colonies and subpopulations that can be obtained from the human umbilical cord blood, and examine the impact of cryopreservation for long periods of time, then thawing cells and culturing them under identical conditions to contribute through in the current studies on human hematopoietic stem cells with a view to keep usable samples in basic research studies on HSCs cells for long-term and effective blood in transplantation. Isolated cells using indigation especially the positive immuno-magnetic election for CD34⁺ cells by Entering some modifications, also the negative immuno-magnetic selection for CD34⁺ cells. after immunophenotyping cells by passing cells through flow cytometry - quadr colors, using a wide range of monoclonal antibodies to identify antigens or different activated show that the method of isolating cells impact on a range of variables that have a role in the outcome of culturing cells and profilation. It was concluded that the modified method of selection enabled to get a significant percentage of the initial precursor generated for the blood, which was surpassed by a moral way of negative selection, which is interpreted by the vast differences between the studies and research on Hematopoietic stem cells, which was derived from the human umbilical cord.blood, Based on the results of ways for isolated cells the follow-up division and reproduction in the media feeding in response to growth factors that supported by those circles, and to identify the differentiation with changing shape, and synchronization of (absence / appearance) of the expression of surface antigens characteristic of stem cells / antigen function to differentiate after motivate mediated by a combination of division factors and differentiation factors, as well as to investigate the safety and study the functional differentiation toward Monocyte-Macrophage and phagocytosis ability and the activity of phagosomes in the case of differentiated cells.

Key words: Hematopoietic stem cells, umbilical cord blood, Monocyte- Macrophages, Immunomagnetic selection, CD34⁺.

قائمة المصطلحات والاختصارات List of abbreviations

المصطلح العربي	المصطلح الأجنبي (الاختصار)
الألوفيكوسيانين	Allophycocyanine (APC)
إنترلوكين-3	Interleukin- 3 (IL-3)
إنترلوكين-6	Interleukin-6 (IL-6)
بيتيد صناعي	N-Formyl- Met Phe- Lue (FMLP)
التشتت الأمامي للضوء	Forward Scatter Light (FSC)
التشتت الجانبي للضوء	Side Scatter Light (SSC)
ثنائي أمين الإيتيلين رباعي حمض الخل (EDTA)	Ethylenediaminetetraacetic acid
ثنائي ميثيل أوكسيد الكبريت	dimethylsulfoxide (DMSO)
الحبيبات المغلفة بالدكستران	Dextran Magnetic Particles (D.M.Particles)
الخلايا البطانية الوعائية	Vascular Endothelial Stem Cells (ETHSCs)
الخلايا الجذعية	Stem Cells (SCs)
الخلايا الجذعية البالغة	Adult Stem Cells (ASCs)
الخلايا الجذعية الجنينية	Embryonic Stem Cells (ESCs)
الخلايا الجذعية العصبية	Neural Stem Cells (NSCs)
الخلايا الجذعية المتوسطة	Mesenchymal Stem Cells (MSCs)
الخلايا الجذعية المولدة للدم	Hematopoietic Stem Cells (HSCs)
الخلايا الجذعية قليلة القدرات	Oligopotent Stem Cells (OSCs)
الخلايا الجذعية كثيرة القدرات المحرصة	Induced Pluripotent Stem Cells(iPSCs)
الخلايا الجذعية وحيدة القدرات	Unipotent Stem Cells (USCs)
الخلايا القاتلة الطبيعية	Natural Killer (NK)
خلايا جذعية شاملة القدرات	Totipotent Stem Cells (TSCs)
خلايا جذعية كثيرة القدرات	Pluripotent Stem Cells (PSCs)
خلايا جذعية متعددة القدرات	Multipotent Stem Cells (MSCs)

Mono Nuclear Cells (MNCs)	الخلايا وحيدة النواة
Graft Versus Host Disease (GVHD)	داء الطعم حيال الثوي
Human Umbilical Cord Blood (HUCB)	دم الحبل السري البشري
Dihydro-Rodamine-123 (DHR-123)	الدهيدورودامين -123
Rodamine-123 (R-123)	الرودامين -123
Euro-Cord Transplant Registry (ECTR)	السجل الأوروبي لغرسات الحبل السري
International Cord Blood Transplant Registry (ICBTR)	السجل الدولي لغرسات الحبل السري
Citrate Phosphate Dextrose Adenine (CPD-A)	سيترات فوسفات دكستروز أدينين
Propidium Iodide (PI)	صبغة البروبيديوم أيودايد
Stem Cells F(SCF)	عامل الخلية الجذعية
Fms-Related Tyrosine Kinase 3 Ligand (Flt-3)	عامل الربيطه (FLT-3)
Macrophage Colony- Stimulating Factor (M-CSF)	العامل المنبه لتجمع الخلايا المحببة- البالعات الكبيرة
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	الفلوريسين إيزو تيو سيانات
Phycoerythrin (PE)	الفيكو إيريترين
Phycoerythrin and Cyanine5 (Per-Cy5)	الفيكوإيريترين -سيانين 5
Phycoerythrin and Cyanine7 (Per-Cy7)	الفيكوإيريترين- سيانين 7
Lishmania Tropica (<i>L.Tropica</i>)	الليشمانيا المدارية
Protein Kinase C Ligand Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	معرض فيزيولوجي قوي
Human Leukocyte Antigen (HLA)	مستضد الخلايا البيض البشرية
Human Serum (HS)	المصل البشري
Fetal Bovine Serum (FBS)	مصل جنين البقر
Tetrameric Antibody Complex (TAC)	معقد الأضداد رباعية الجزيئات
Aorta-Gonad-Mesonephros region (AGM)	منطقة الغدد التناسلية للشريان الأورطي
Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)	نقص المناعة المكتسبة
Bone Marrow (BM)	نقي العظم

Colony Forming Units (CFUs)	الوحدات المكونة للمستعمرات الخلوية
Iscoves Modefied Dulbeccos Medium (IMDM)	وسط استنبات مغذي IMDM
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	وقاء ملحي فوسفاتي

المصطلح الأجنبي

المصطلح العربي

Leukemia	ابيضاض الدّم
Independent Sample t-test	اختبار مقارنة المتوسطات المستقلة
In Vitro Fertilization	الإخصاب في الزجاج
Thawing	إذابة
Transplantation	ازدراع
Depletion	الإستنفاد
Ethical Delimmas	الإشكاليات الأخلاقية
Tetrameric Antibodies	أضداد رباعية الجزيئات
Mouse Anti Human	أضداد فأرية – بشرية
Fluorescence Anti-Bodies	أضداد مقرونة بأصبغة قابلة للتألق
Monoclonal Antibodies	أضداد وحيدة النسيلة
Reprogramming	إعادة برمجة
Enrichment	الإغناء
Pre-Enrichment	الإغناء الأولي
Affinity	الألفة
Positive Selection	الانتقاء الإيجابي
Negative Selection	الانتقاء السلبي
Lineages	أنسال
Self-Renewal	الانقسام الذاتي
Isopropanol	الإيزوبروبانول

Metabolites	الأيض
Macrophages	بالعات كبيرة
Gate Analysis	بوابة التحليل
Zygote	البيضة الملقحة
Molecular Biology	البيولوجيا الجزيئية
Micro Environment	البيئة الصغيرة
Light Fluorescence	التألق
Scatter	التبعثر (التشتت)
Cell Gating	تبريب الخلايا
Centrifugation	التنقيط (النبد)
Cryopreservation	تجميد (حفظ بالبرودة)
Granularity	التحبيب
Sub-Population	تحت جمهرة خلوية
Cell Cycle Analysis	تحليل الدارة الخلوية
Light Scatter	تشتت الضوء
Multiple Scleroses	التصلب المتعدد
Clonogenic	التضاعف
Gene Expression	التعبير الجيني
Bright Expression	تعبير مرتفع
Low Expression	تعبير منخفض
Hematopoiesis	تكون الخلايا الدموية
Confluence	التمادي الخلوي
Differentiation	التمييز
Low Oxygen tension	توتر الأوكسجين المنخفض
Expansion	التوسع النسيلي

Telomere	التيلومير
Adhesion Moleculars	جزيئات التصاقية
Phagosomes	جسيمات البلعمة
Population	جمهرة خلوية
Signaling Events	حادثات نقل الإشارة
Nono-Particles	الحبيبات النانوية
Eosinophils	الحمضات
Stromal Stem Cells	الخلايا الجذعية السدوية
Lymphoid	الخلايا اللمفية
Erythroid	الخلايا المولدة للكريات الحمر
Primitive Cells	خلايا بدئية
Megakaryocytes	الخلايا كبيرة النواة
Mature Cells	خلايا ناضجة
Class II Laminar Flow Hood	خيمة زرع من الصف الثاني
Cell Cycle	الدائرة الخلوية
Peripheral Blood	الدم المحيطي
Ligands	ربائط
Amniotic Fluid Stem Cells	السائل الأمنيوسي
Signaling Pathways	سبل إشارية
Series	سلاسل
Progenitors	السلائف
Hematopoietic Progenitors	السلائف المولدة للدم
Non-Hematopoietic Stem Cells	سلائف غير مولدة للدم
Lymphoid Progenitors	سلائف مولدة للخلايا اللمفاوية
Myeloid Progenitors	سلائف مولدة للخلايا النقوية

Cytokines	السيتوكينات
Auto-Fluorescence Control	شاهد التآلق الذاتي
Isotype control	شاهد النمط المثل
Morphology	شكل
Trypan Blue	صبغة التريبان الأزرق
Platelet	الصفائح
Fluorescence Light	ضوء تآلقي
Kit	عتيدة
Neutrophils	العدلات
Isolation	العزل
Gene Therapy	العلاج الجيني
Cell-Based Therapy	العلاج الخلوي
Transcription Factors	عوامل الانتساخ
Hematopoietic Growth Factors	عوامل نمو الخلايا الجذعية الدموية
Sever Chronic Immunodeficiency	العوز المناعي المشترك الشديد
Immunodeficiency	عوز مناعي
Control	العينة الضابطة
Viability	العيوشية
Buffy Caot	غلالة بيضاء
Sorting	الفرز
Separation	الفصل
Magnetic Separation	الفصل المغناطيسي
Anemia	فقر الدم
Macrocytic Anemia	فقر دم الخلايا
Fanconi Anemia	فقر دم فانكوني

In Vitro	في الزجاج
In Vivo	في الكائن الحي
Flow Cytometry	قياس الجريان الخلوي
Inner Mass Cell	الكتلة الخلوية الداخلية
Nish	كنف (عش)
Kocher Clamp	كوشر معدني
Yolk Sac	الكيس المحي
Blastocyst	الكيسة الأرومية
Donor	المتبرع
Parameter	متغير
Lysing Reagent	محلول حال
Diabetes type 1	مرض السكري من النمط 1
Spleen Colony Assay	المستعمرات الخلوية في طحال الفئران
Surface Receptors	مستقبلات سطحية
Placenta	المشيمة
Penicillin/Streptomycin	مضاد بكتيري بنسيلين/ستربتومييسين
Amphotericine	مضاد فطري أمفوتيريسين
Cluster Of Differentiation	معقدات عناقيد التمايز
Dot Plot	المنحنيات البيانية النقطية
FC-Region Fragment	منطقة الشدفة FC
Haemophilia	الناعور
Liquid Nitrogen	النتروجين السائل
Allogeneic Transfer	نقل خيفي
Immunophenotype	النمط المناعي
Quiescent	هاجعة

Aging

هرم الخلية

Tissue Engineering

الهندسة النسيجية

Monocytes

وحيدات

Myelomonocytic

وحيدات النوى النقية

Monoclonal

وحيدة النسيلة

Ficoll-Paque

وسط الفيكول

Medium

وسط مغذي

Application of a Modified Immunomagnetic Positive Selection Method for Isolation of Human CD34⁺ Stem/Progenitor from Cord Blood

¹Ranad Al-Kadry; ¹Souad Al-Okla; ²Majed Al-Jamali; and ³Lama Youssef

¹Dept. of Biology, Faculty of Sciences

²Dept. of Biochemistry and Microbiology, Faculty of pharmacy

³Dept. of Pharmaceutics, Faculty of pharmacy,
University of Damascus, Damascus, Syria

ABSTRACT

ID # (2777)

Received: 13/09/2013

In-revised: 22/10/2013

Corresponding Author;

Souad Al-Okla

E-mail: soka65@yahoo.com

Umbilical cord blood (UCB) and isolated umbilical cord blood stem cells (UCBSCs) have become an alternative source of hematopoietic progenitor cells for transplantation. The aim of this study was to test the effectiveness of some modifications of human hematopoietic stem cells isolation protocols with the intention of improving the output and viability of CD34⁺ cells and progenitor subpopulations progeny that can be obtained from a sample of human umbilical cord blood. By that, we contribute to current studies on the human hematopoietic stem cells (HSCs) in order to bank UCB units suitable for basic research of very-long-term hematopoietic as well as for transplantation. Cord blood samples were transformed to buffy coat prior to the isolation of HSCs which was performed by two steps involving CD34 pre-enrichment using human cord blood CD34 positive selection kit and an Immunomagnetic cell separation, targeting CD34 surface antigen. CD34⁺ cells were immunophenotyped by four-color fluorescence, using a large panel of monoclonal antibodies (CD34/PE, CD45/FITC, CD38/APC, CD33/Per-Cy, HLA-DR/PE, CD117/APC, CD123/Per-Cy, CD105-FITC, CD56/PE, CD14/Per-Cy, CD19/Per-Cy and CD3/APC) recognizing different lineage or activation antigens. Our results showed that the percentage of CD34⁺ cells in whole human cord blood samples was 0.02% of total cells. After isolation by two-step, combining CD34 pre-enrichment and Immunomagnetic isolation, the frequency of CD34⁺ stem cells represented 0.65% among total MNCs and 83.53% among total isolated cells. This isolation led to a purity of over 95% and viability of 98.60%. In addition, we found that the percentage of CD34⁺ cells which are CD45⁺ was 83.53%, whereas CD34⁺CD38⁻ cells comprised 21.70%. About 70.85% of isolated CD34⁺ cells were characterized by the absence of human leukocyte antigen-DR (HLA-DR). Concerning the CD117, CD33, CD123 and CD105 antigens which characterize true stem cells, we found a high expression percentage among isolated HUCB CD34⁺ cells (81.26%, 57.14%, 47.45%, 58.52% for CD117, CD33, CD123 and CD105, respectively), while a very small number displayed markers of advanced myeloid commitment, such as CD14 (Myeloid lineage, 0.7%) and CD56 (NK-cell lineage, 4.48%), or those of lymphoid differentiation: CD3 (T-cell lineage, 5.22%), and CD19 (B-cell lineage, 1.76%). After testing 12 samples of cord blood using modified positive magnetic isolation technique, no variations in subpopulations were observed from sample to sample. We conclude that our modified technique enabled us to obtain an important proportion of primitive hematopoietic progenitors, as suggested by the absence of HLA-DR and CD38, as well as the presence of CD117, CD33, CD123, and CD105 on their surface. These cells are recognized as having long-term reconstitution capacity within the human CD34⁺ cell population.

KEYWORDS

Hematopoietic stem cells (HSCs), CD34⁺ cells, Human umbilical cord blood, immunomagnetic separation, Immunophenotyping, Hematopoietic progenitors.

تطبيق طريقة مُعدّلة للانتقاء المناعي الايجابي لعزل الخلايا الجذعية CD34⁺ والخلايا السليفة البشرية من دم الحبل السري

ارناد القادري، اسعاد العقلة،² مجد الجمالي، و³لمى يوسف

¹ قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم
² قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة
³ قسم الصيدلانيات، كلية الصيدلة
جامعة دمشق، دمشق، سوريا

المُستخلص

أصبح دم الحبل السري والخلايا الجذعية المعزولة من دم الحبل السري يشكّلان المصدر البديل لسلائف الخلايا المُؤدّة للدم التي تستعمل في عمليات الاغتراس. تهدف هذه الدراسة إلى اختبار فعالية بعض التعديلات على طرق عزل الخلايا الجذعية البشرية المُؤدّة للدم بغية تحسين مردود وحيوية نساقل الخلايا CD34⁺ وتحت المجموعات السليفة التي يمكن الحصول عليها من دم الحبل السري البشري ويمكن المساهمة من خلال ذلك في الدراسات الحالية على الخلايا الجذعية المُؤدّة للدم البشرية بغية حفظ عينات قابلة للاستعمال في الدراسات البحثية الأساسية على الخلايا المُؤدّة للدم طويلة الأمد والفعالة في عمليات الاغتراس. حُوّلت عينات دم الحبل السري إلى غلالة بيضاء قبل عزل الخلايا الجذعية المُؤدّة للدم والتي أجريت على مرحلتين تضمنتا: الإغناء الأولي بالخلايا CD34⁺ باستعمال عتيدة خاصة بالانتقاء الإيجابي للخلايا CD34⁺ من دم الحبل السري البشري، ومن ثم الفصل الخلوي المناعي المغناطيسي الذي استهدف المستضد السطحي CD34. نُمطت الخلايا CD34⁺ مناعياً بإمرار الخلايا في جهاز التّدق الخلوي رباعي اللون، وباستعمال مجموعة كبيرة من الأضداد وحيدة النسيلة CD34/PE، CD45/FITC، وCD38/APC، وCD33/Per-Cy، وHLA-DR/PE، وCD117/ APC، وCD123/Per-Cy، وCD105-FITC، وCD56/PE، وCD14/Per-Cy، وCD19/Per-Cy، وCD3/APC) تتعرف على مستضدات نسيلية أو مُعدّلة مختلفة. وقد بينت نتائجنا أن النسبة المئوية للخلايا CD34⁺ في عينة دم الحبل السري بلغت 0.02 % من مجموع الخلايا. وشكّل تواتر الخلايا الجذعية CD34⁺، بعد عزلها بإتباع مرحلتين ترافق فيهما الإغناء الأولي بالخلايا CD34⁺ بالعزل المغناطيسي المناعي، 0.65 % من مجموع الخلايا وحيدة النواة و 83.53 % من مجموع الخلايا المعزولة. ولقد قاد هذا العزل إلى الحصول على هذه الخلايا بنقاوة تزيد على 95 % وحيوية 98.60 %. كما وجدنا أن النسبة المئوية للخلايا CD34⁺ الإيجابية للمستضد CD45 هي 83.53 %، بينما تبين أن الخلايا CD34⁺CD38⁻ تُشكّل 21.70 % من الخلايا CD34⁺ ووصفت حوالي 70.85 % من الخلايا CD34⁺ المعزولة بغياب مستضد الكريات البيضاء من النمط DR (HLA-DR). وفي ما يتعلق بالمستضدات CD117 وCD33 وCD123 وCD105 التي تُميّز الخلايا الجذعية الحقيقية، فلقد أشارت نتائجنا إلى ارتفاع نسبة التعبير عنها بين الخلايا CD34⁺ (81.26 % و 57.14 % و 47.45 % و 58.52 % للواسمات CD117 وCD33 وCD123 وCD105، على التوالي)، بينما أبدت مجموعة صغيرة جداً من الخلايا واسمات الخلايا التي تلتزم الخط النقوي المُتقدّم كما هو حال الواسمة CD14 (سلالة وحيدات النوى، 0.7 %) وCD56 (سلالة القتل الطبيعيون، 4.48 %) أو تلك الخاصة بالتمايز اللمفي: CD3 (سلالة اللمفاويات التائية، 5.22 %) وCD19 (سلالة اللمفاويات البائية، 1.76 %). تم في هذه الدراسة اختبار 12 عينة من دم الحبل السري باستعمال تقنية العزل المغناطيسي الإيجابي المُعدّلة ولم يتم ملاحظة أي اختلافات معنوية في النسب المئوية لتحت المجموعات المعزولة. وبالتالي نستنتج أن طريقتنا المُعدّلة مكننتنا من الحصول على نسبة مهمة من السلائف الأولية المُؤدّة للدم التي تتصف بغياب مستضد الكريات البيض HLA-DR والواسمة CD38 وبوجود المستضدات CD117 وCD33 وCD123 وCD105 على سطوحها. وتعرف هذه الخلايا بقدرتها على الترميم طويل الأمد من بين الخلايا CD34⁺ البشرية.

رقم المسودة: (2777)

استلام المسودة: 2013/09/13

استلام المعدلة: 2013/10/22

الباحث المراسل:

اسعاد العقلة

بريد الكتروني:

soka65@yahoo.com

الكلمات الدالة

الخلايا الجذعية المُؤدّة للدم، الخلايا CD34⁺، دم الحبل السري البشري، العزل المناعي المغناطيسي، التنميط المناعي، السلائف المُؤدّة للدم