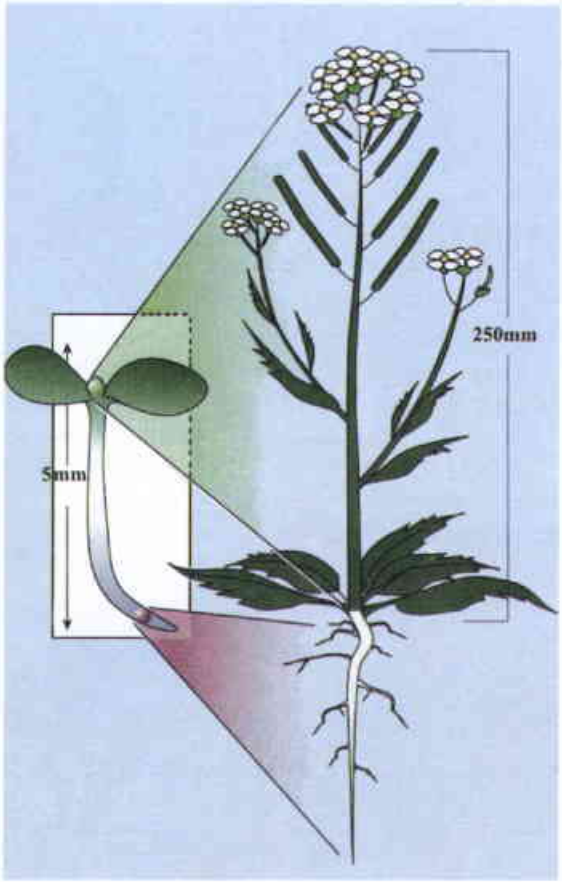
عالَم الذرّة

مجلة هيئة الطاقة الذرية السورية



87

السنة الثامنة عشرة / أيلول-تشرين الأول

2003

مجلة دورية تصدر ستّ مرّات في السنة عن هيئة الطاقة الذرّية في الجمهورية العربية السورية وتهدف إلى الإسهام في نشر المعرفة العلمية باللغة العربية في الميدانين الذرّي والنووي وفي كل ما يتعلق بهما من تطبيقات.

المدير المسؤول

الدكتور إبراهيم عثمان

المدير العام لهيئة الطاقة الذرية

هيئة التحرير

الدكتور توفيق قسام

رئيس هيئة التحرير

الدكتور محمد قعقع

الدكتور فؤاد العجل

الدكتور أحمد الحاج سعيد

الدكتور محمد فؤاد الرباط

الدكتور إلياس أبو شاهين

هيئة الطاقة الذرية السورية

مكتب نظم المعلومات

http://serversmiso.aecs.sy

شروط الترجمة والتأليف للنشر في مجلة عالم الذرة

1- ترسل نسختان من مادة النشر باللغة العربية مطبوعتان بالآلة أو مكتوبتان بالحبر بخط واضح، على وجه واحد من الورقة، وبفراغ مضاعف بين السطور.

2- يُكتب على ورقةٍ مستقلة عنوان مادة النشر واسم الكاتب وصفته العلمية وعنوانه مع ملخصين لها أحدهما بالعربية والآخر باللغة الإنكليزية حصراً، في حدود عشرة اسطر لكل منهما، ويطلب من كل من المؤلف والمترجم كتابة اسمه كاملاً، باللغتين العربية والأجنبية، ولقبه العلمي وعنوان مراسلته.

3- يُقدم المؤلف أو المترجم في ورقة مستقلة قائمة بالعبارات التي تشكل الكلمات المفتاحية «Key Words» (والتي توضح أهم ما تضمنته المادة من حيث موضوعاتها وغايتها ونتائجها والطرق المستخدمة فيها) وبما لا يتجاوز عشر عبارات باللغتين العربية والإنكليزية.

4- إذا سبق نشر هذا المقال أو البحث في مجلة أجنبية، ترسل الترجمة مع صورة واضحة عن هذه المادة المنشورة. ويستحسن إرسال نسخة الأصل المطبوع والأشكال (الرسوم) الأصلية، إن وجدت، ولو على سبيل الإعارة.

5- إذا كانت المادة مؤلفة أو مجمّعة من مصادر عدّة، يذكر الكاتب ذلك تحت العنوان مباشرة كأن يقول «تأليف، جمع، إعداد، مراجعة...» ويرفق المادة بقائمة مرقمة للمراجع التي استقاها منها.

6- إذا تضمنت المادة صوراً وأشكالاً، ترسل الصورة الأصلية وكذلك الأشكال مخططة بالحبر الأسود على أوراق مستقلة، إلاّ إذا كانت موجودة في المادة المطبوعة بلغة أجنبية (كما جاء في الفقرة «4»)، مرقمة حسب أماكن ورودها.

7- يرسل مع المادة قائمة بالمصطلحات العلمية العربية المستخدمة فيها مع مقابلاتها الأجنبية إذا لم تكن واردة في معجم الهيئة للمصطلحات العلمية والتقنية في الطاقة الذرية، الذي تم نشره في أعداد المجلة (2-18).

8- تكتب المصطلحات وكذلك أسماء الأعلام باللغتين العربية والأجنبية عند ورودها في النص أول مرة ومن ثم يُكتفى بإيراد المقابل العربي وحده سواء أكان هذا المقابل كاملاً أم مختزلاً. وتستعمل في النص المؤلَّف أو المترجَم الأرقام العربية 1, 2, 3 أينما وردت مع مراعاة كتابتها بالترتيب العربي من اليمين إلى اليسار. وإذا ورد في نص معادلةٍ أو قانون أحرف أجنبية وأرقام فتكتب المعادلة أو القانون كما في الأصل الأجنبي.

9- يُشار إلى الحواشي، إن وجدت، بإشارات دالّة (★ , + , X, O...) في الصفحة ذاتها، كما يشار في المتن إلى أرقام المصادر والمراجع المدرجة في الصفحة الأخيرة، وذلك بوضعها ضمن قوسين متوسطين [ ].

10- تُرقم مقاطع النص الأجنبي والنص العربي بترتيب واحد في حالة الترجمة.

11- يرجى من السادة المترجمين مراعاة الأمانة التامة في الترجمة.

12- تخضع مادة النشر للتقييم ولا تُرد إلى أصحابها نشرت أم لم تنشر.

13- يمنح كل من الكاتب أو المترجم أو المراجع مكافأة مالية وفق القواعد المقررة في الهيئة.

14- توجه المراسلات باسم رئيس هيئة التحرير إلى العنوان التالي:

الجمهورية العربية السورية – هيئة الطاقة الذرّية – مكتب الترجمة والتأليف والنشر – مجلة عالم الذرّة – دمشق – ص. ب 6091

E-mail: aalam_al_zarra@aec.org.sy

رسوم الاشتراك

الاشتراك السنوي للطلاب (200) ل.س – الاشتراك السنوي للأفراد (300) ل.س – الاشتراك السنوي للمؤسسات (1000) ل.س

الاشتراك السنوي للأفراد من خارج القطر العربي السوري (30) دولاراً أمريكياً. وللمؤسسات (60) دولاراً أمريكياً – تتضمن الاشتراكات أجور البريد

بالنسبة للمشتركين من خارج القطر يُرسل رسم الاشتراك إلى العنوان التالي:

المصرف التجاري السوري فرع رقم 13
مزة – جبل – ص.ب 16005
رقم الحساب 2/3012

أو بشيك باسم هيئة الطاقة الذرّية السورية

يمكن للمقيمين داخل القطر دفع قيمة الاشتراك بحوالة بريدية على العنوان التالي:

مجلة عالم الذرّة – مكتب الترجمة والتأليف والنشر – هيئة الطاقة الذرّية السورية – دمشق – ص. ب 6091

مع بيانٍ يوضح عنوان المراسلة المفضل

أو تدفع مباشرة إلى مكتب الترجمة والتأليف والنشر في الهيئة – دمشق – شارع 17 نيسان

سعر العدد الواحد

سورية 50 ل.س / لبنان 3000 ل.ل / الأردن 2 دينار / مصر 3 جنيه / الجزائر 100 دينار / السعودية 10 ريال و6 دولارات في البلدان الأخرى.

تود مجلة عالم الذرّة إعلام الشركات والمؤسسات العاملة في قطاع التجهيزات العلمية والمخبرية كافة والصناعات المتعلقة بها عن فتح باب الإعلان التجاري فيها.

للمزيد من الاستفسار حول رغبتكم بنشر إعلاناتكم التجارية الكتابة إلينا على العنوان التالي:

هيئة الطاقة الذرّية السورية – مكتب الترجمة والتأليف والنشر

دمشق ص.ب 6091 – الجمهورية العربية السورية

أو الاتصال على رقم الهاتف6111926/7 – فاكس 6112289

ISSN 1607-985X

تقديم

أحرز علم البيولوجيا تقدماً هائلاً منذ نشر واتسون وكريك نموذج الحلزون المضاعف كبنية جزيئية للدنا عام 1953. ومنذ ذلك الوقت بدأ العلماء بسبر أغوار علم الحياة وفهم الآليات الحيوية فهماً دقيقاً. وتُوِّج ذلك بمشروع الجينوم البشري الذي نُشرت نتائجه منذ سنتين، ولا تزال تُنشر بعض مضامينه حتى يومنا هذا. وفُهم جيداً أن الجينوم هو المسيطر تماماً على جميع الفعّاليات الحيوية، وأن لكل مورثة، أو مجموعة مورثات، آلية للعمل والضبط والتعبيرية تكون نتيجتها ظهور عمل حيوي يتجلى بنمط ظاهري.

وبما أن الأنماط الخلوية الوظيفية في جسم الكائن الحي شديدة التخصُّص وتقوم بأعمال نوعية لكل نمط خلوي، كان السؤال المطروح منذ أكثر من قرن هو كيف يحدث تمايز الخلايا الفتية وكيف تنتهي بتمايز وظيفي نوعي؟ ما هو شكل التعبيرية المورثية وما مداها أثناء مسيرة التمايز هذه؟ كيف تصمت مورثات كانت فاعلة في الحياة الجنينية وتُفعَّل مورثات مغايرة أخرى في الحالة الوظيفية؟ والسؤال الأهم في هذا الإطار هو: هل هذا الفعل عكوس؟ بمعنى آخر، هل يمكن إعادة خلية متخصصة بفعل حيوي محدّد إلى الحالة البدئية لتعيد سيرة أخرى؟ أو هل يمكن العودة عن تمايز خلية متخصّصة لتصبح غير متمايزة كما كانت في البدء؟ وهل يمكن إعادة برمجة كامل جينومها الوراثي لتُنفِّذ برنامجاً جديداً؟

بدت هذه الأسئلة للوهلة الأولى وكأنها ضرب من الخيال، أو نوع من الخيال العلمي. ومع تقدم أساليب البحث العلمي وأدواته برزت تقانات حديثة ومتطورة سُمّيت التقانات الحيوية مكّنت الباحثين من اختيار مثل هذه الأفكار والحصول على نتائج مدهشة. ولعل أبرز هذه التقانات الحيوية تقانات البيولوجيا الجزيئية الفائقة الدقة، وتقانات الهندسة الوراثية الفائقة المهارة، وهي التي مكّنت من مناقلة المورثات وفهمها وتجريبها. وكان من نتاج هذه التقانات حدوث انتقالات مهمّة في علم الحياة، موجَّهة في البدء للزراعة والنباتات ومن ثم للحيوانات، وأخيراً للإنسان.

ولعل من أبرز الانتقالات في مجال الزراعة، الحصول على نباتات محوَّرة وراثياً أي توليد نباتات قادرة على مقاومة الإجهادات البيئية المختلفة كالبرودة والحرارة وملوحة التربة وجفافها، والإجهادات الحيوية كمقاومة الأمراض بأنواعها المختلفة، مع زيادة في المجموع الخضري والثمري، أما الانتقالات في المجال الحيواني فقد توجَّهت نحو إنتاج مركّبات حيوية ذات فائدة علاجية كإنتاج الأنسولين والإنترفيرونات وغيرها مما يفيد في مكافحة الأمراض. أما الانتقالات لدى الإنسان فقد برزت في الكشف عن هوية المورثات لأسباب تشخيصية أو علاجية أدّت إلى نشوء فروع مثل العلاج المورثي أو العلاج الخلوي امتدت إلى مقاربة في الحياة الجنينية، ضمن إطار سُمّي التشخيص قبل الولادي، الوراثية منها والاستقلابية وغيرها. وقد مكّنت التقانات الحيوية عند الإنسان أيضاً من تطوير الإلقاح في الزجاج وحفظ النطاف والبيوض والأجنّة لفترات مديدة لإعادة استخدامها.

ولعل أبرز تطبيقات التقانات الحيوية المثيرة للجدل هو انتسال كائنات حيّة بلغت حدَّ محاولة انتسال الإنسان. ويقوم هذا التطبيق على فكرة إعادة برمجة كاملة للجينوم حتى حدود المقدرة الكامنة الحيوية الكلّية، ثم توجيه هذه المقدرة لإعادة سيرة تشكُّلٍ جنيني كامل، وهو حلم راود علماء الحياة منذ فترة طويلة.

ومن التطبيقات المدهشة في الوقت الحاضر للتقانات الحيوية أن تُطوّع خلايا خاصة موجودة في الجسم تدعى الخلايا الجذعية وتجعلها تُنفّذ برنامجاً مماثلاً لبرنامج التشكُّل الذي تخضع له نواة خلية جسمية في تقانة الانتسال. إن الخلايا الجذعية البالغة في الجسم الحي هي خَلَف الخلايا الجذعية الجنينية، انعزلت منذ ذلك الوقت ضمن أعشاش ذات تكوين وتركيب خاص بكل نمط، واحتفظت بمقدرة تشكُّلية كامنة متعددة قادرة على تجديد نفسها وعلى توليد خلايا متمايزة متخصّصة وظيفية ونوعية طيلة حياة الفرد، تمكّنه من ترميم التالف من خلاياه وأنسجته.

تبدو فكرة استخدام الخلايا الجذعية لانتسال أنسجة، أو حتى أفراد، ضرباً من الترف العلمي. ولكن لو تخيلنا أننا نستطيع انتسال وتوليد خلايا عصبية ودبقية من خلايا جذعية لفرد أُجريت له جراحة استئصال ورم عصبي، واستزرعنا هذه الخلايا المنسَّلة مكان الجزء المستأصل، وتمايزت هذه الخلايا وأصبحت وظيفية وعوّضت الخلايا المستأصلة، ألا يمكن عندها إعادة تأهيل هذا الفرد وإرجاعه إلى الحالة السوية؟ ولو طبقنا الشيء نفسه على فرد آخر مصاب بابيضاض الدم (لوكيميا)، وأعدنا استزراع نسائل نقوية جديدة له بعد التخلص من النقي المريض، ألا يستأهل ذلك التجربة والعناء؟ وبالمنهجية نفسها يمكن التفكير بحالات أخرى في أماكن أخرى من الجسم. ومن هنا برز هذا المجال كفرع جديد في العلاج دُعي بالعلاج الخلوي. لقد بدأ العمل حثيثاً في هذا المجال، والعجلة دارت ويبدو أنها لن تتوقف.

نقدم في هذا العدد الخاص من مجلة عالم الذرّة، ترجمات مهمّة لمقالات علمية رائدة حول الخلايا الجذعية وتطبيقاتها، اخترناها من أفضل المجلات العلمية العالمية، لشعورنا بأهمية هذا الموضوع ولما يدور من جدل حول ذلك في الوقت الحاضر في جميع أنحاء العالم. وقد توخّينا التنويع في اختيار هذه المقالات، فهنالك مقالات مرجعية تُعرّف بالخلايا الجذعية وصفاتها وإمكاناتها التطبيقية، ومقالات حول أعمال بحثية كاملة مجرَّبة على خلايا جذعية عصبية أو بشْرية أو هيكلية أو دموية...، تُعرُف بطرائق البحث وخصوصية كل نمط من أنماط الخلايا الجذعية، ثم مقالات تعرض آراء متنوعة وأحياناً متضاربة حول أخلاقيات استخدام هذه الخلايا وآراء اجتماعية وفلسفية وعقائدية متعلّقة بذلك.

وأخيراً لا بد من الإشارة إلى أن هيئة الطاقة الذرّية السورية قد استوعبت أهمية التقانات الحيوية والبيولوجيا الجزيئية منذ فترة طويلة، وأنشأت لهذا الغرض قسماً مختصاً بها وخطت خطوات أولى في تطبيع وتطويع هذه التقانات، وعقدت الكثير من الندوات وحلقات البحث حولها، كما شاركت في الكثير من المناسبات مع مؤسسات متعددة في سورية للتعاون في هذا المضمار، ولا نبغي من وراء ذلك سوى أن نقوم بواجبنا في دفع العمل العلمي المتطور إلى مستويات أعلى في سورية مساهمة منا في نهضة علمية مباركة بقيادة رائد التحديث والتطوير **السيد رئيس الجمهورية الدكتور بشار الأسد.**

الأستاذ الدكتور إبراهيم عثمان

المدير العام لهيئة الطاقة الذرّية السورية

في هذا العدد

المقالات

☐ اهبطي من جنّة عدْن: الخلايا الجذعية وأعشاشها . . . . . ف. م. وات، ب. ل. م. هوغان 7
ترجمة الدكتور عادل باكير

☐ لماذا الخلايا الجذعية؟ . . . . . د. فاندر كوي، س. فايس 14
ترجمة الدكتور إياد غانم

☐ الدَّور الحاسم للعش في تقرير مصير الخلايا الجذعية الميلانينية . . . . . إمي. ك. نيشيمورا وآخرون 19
ترجمة الدكتور عمار مدنية

☐ نقل نتائج بحوث بيولوجيا الخلايا الجذعية وأسلافها إلى التطبيق السريري: العوائق والحظوظ . . . . . إ. ل. وايزمن 27
ترجمة الدكتور عدنان الاختيار

☐ تغيير المقدرة الكامنة باندماج تلقائي . . . . . ك – ل. ينغ وآخرون 35
ترجمة هيئة التحرير

☐ سلالات خلوية جذعية جنينية من أكياس أرومية بشرية: تمايز جسمي في الزجاج . . . . . ب. ي. روينوف وآخرون 40
ترجمة الدكتور أحمد عثمان

☐ تمايز الطلائع العصبية القابلة للازدراع المأخوذة من خلايا جذعية جنينية بشرية في الزجاج . . . . . س – ش. زهانغ وآخرون 50
ترجمة الدكتور محي الدين عيسى

☐ الخلايا النجمية: نجوم جديدة للدماغ . . . . . ف. فريغر، س. شتاينمتز 58
ترجمة الدكتور غسّان عليا

☐ خلايا الدبق العصبي النجمية تحرّض على تكوين العصبونات من الخلايا الجذعية العصبية البالغة . . . . . هـ. سونغ وآخرون 64
ترجمة الدكتور غسّان عليا

☐ تعدُّد قدرات الخلايا الجذعية المتوسطية من منشأ نقوي بالغ. . . . . ي. جيانغ وزملاؤه 74
ترجمة الدكتور وليد الأشقر

☐ خلايا نقي العظم تتبنى النمطَ الظاهري لخلايا أخرى باندماج خلوي تلقائي . . . . . ن. تيرادا وآخرون 88
ترجمة الدكتور عبد الرحمن مراد

☐ خلايا نقي العظم ترمّم عضلة القلب المصابة بالاحتشاء . . . . . ج. كاجستيرا، وآخرون 93
ترجمة الدكتور أيمن المريري

☐ الخلايا الجذعية في النسج الظهارية . . . . . ج. م. و. سلاك 100
ترجمة الدكتور أحمد عثمان

☐ الخلايا الجذعية التي تصنع الجذوع . . . . . د. وايجل، وآخرون 105
ترجمة الدكتور نجم الدين الشرابي

أخبار علمية

☐ اندماج خلوي يسبب إرباكاً 113
☐ مفاهيم جديدة تتطلب كلمات جديدة في جدل الخلية الجذعية 115

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

☐ طعوم جنينية للعصبون تمهّد الطريق لعلاجات بالخلية الجذعية 116
☐ فأر أحادي النّسيلة؟ 118
☐ استخدام تسميات غير مناسبة يجعل باحثاً في الخلايا الجذعية في مأزق 120
☐ أوربة تواجه تحدّي البحث في الخلايا الجذعية الجنينية 121
☐ تنافس الخلايا الجذعية 123

ملخصات باللغة الإنكليزية عن الموضوعات المنشورة في هذا العدد. 132

يُسمح بالنسخ والنقل عن هذه المجلة للاستخدام الشخصي بشرط الإشارة إلى المرجع، أما النسخ والنقل لأهداف تجارية فغير مسموح به إلا بموافقة خطية مسبقة من الهيئة.

اهبطي من جنّة عدْن:
الخلايا الجذعية وأعشاشها*

ف. م. وات
مختبر الصندوق الملكي لتمويل أبحاث السرطان، لندن، المملكة المتحدة.
ب. ل. م. هوغان
المركز الطبي لجامعة فاندربيلت - ناشفيل، الولايات المتحدة الأمريكية.

ملخص

ذاعت أخبار الخلايا الجذعية في الوقت الحالي لسببين اثنين: أوّلهما هو نجاح استنبات سلالات من الخلايا الجذعية الجنينية البشَرية، وثانيهما هو ظهور تقارير حول مقدرة الخلايا الجذعية البالغة على التمايز لتعطي أنماطاً من الخلايا لا تمتّ بِصلة لبعضها البعض من الناحية التخلّقية، كتحوّل الخلايا العصبية إلى خلايا دموية. وتتحكّم إشارات داخلية المنشأ وخارجية المنشأ بتقرير مصير الخلايا الجذعية، وبعض هذه الإشارات معروف الآن. وهناك خصائص معيّنة يتصف بها الوسط الدقيق، العش niche، الخاص بالخلايا الجذعية، يحافظ عليها بين الأنسجة، ويمكن استغلال هذا الانحفاظ في تطبيقات الخلايا الجذعية في العلاج الطبي القائم على استبدال الأنسجة.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية، تمايز خلوي، انقسام خلوي لامتناظر، عش، عامل الانتساخ، نقل الإشارة، ميقاتية ضمن خلوية

مقدّمة

لقد ذاعت أخبار الخلايا الجذعية بشكلٍ واسع في أيامنا هذه. أما نبأ إمكانية استنبات الخلايا الجذعية المتعددة القدرات انطلاقاً من أجنّة بشرية مجهَضة أو من أجنّة فائضة ناتجة عن التلقيح في أنابيب الاختبار [1]، فقد قوبل إما بالحماس أو بالازدراء. وتُعدّ التطبيقات الطبية القوية الاحتمال للعلاج القائم على استبدال الأنسجة غايةً في الإثارة، غير أن المراقبين يتوخّون الحذر، وهو أمر مفهوم نظراً لوجود مسائل أخلاقية لا تزال معلّقة. والأمر الأقل إثارة للجدل، لكن له أهمية إخبارية مساوية، هو ذلك الفيض من التقارير التي تقول بأن الخلايا الجذعية المشتقة من الأنسجة البالغة تمتلك قدراتٍ كامنة على التمايز أوسع بكثير مما كان يُعتقد سابقاً [2]. وتُعقد الآمال على إمكانية استغلال هذه اللدونة التي كنّا غافلين عنها من أجل توليد الخلايا لاستخدامها في الطعوم النسيجية الذاتية.

بعد تسليط الأضواء على الخلايا الجذعية، تبيّن وجود ثغرات في معرفتنا عنها يجب ملؤها إذا كنّا نريد الاستفادة القصوى من جميع القدرات الكامنة لهذه الخلايا في علاج أمراض ضمور مدمّرة مثل داء باركينسون Parkinson disease أو الخثل العضلي muscular dystrophy. ولا بدّ لنا من معرفة المزيد حول آليات التحكّم الداخلية المنشأ التي تحافظ على بقاء الخلايا جذعية كخلايا جذعية أو تسيّرها في مسارات خاصة تمايزية. وعوامل ضبط داخلية كهذه هي بدورها حسّاسة لتأثيرات الوسط الدقيق (العش)، حيث تقبع الخلايا الجذعية عادةً: فما هي "جنّة عدْن" هذه التي تُطرد منها ذُرّية الخلايا الجذعية لتواجه التمايز والموت؟

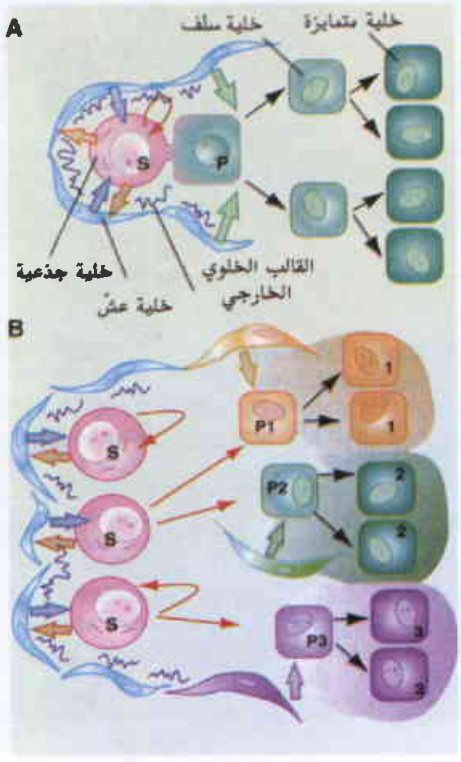
ما هي الخلية الجذعية بالضبط؟

بالرغم من بقاء هذا السؤال محلّ نزاع بعد 30 سنة من الجدل [3]، فإن الرأي السائد هو أن الخلايا الجذعية هي خلايا تتمتع بقدرة على التجدّد الذاتي اللامحدود أو المديد، بحيث تستطيع توليد نمط واحد على الأقل من ذُرّية عالية التمايز. وما بين الخلية الجذعية وذرّيتها النهائية المتمايزة توجد هناك عادةً جماعةٌ انتقالية من الخلايا المولّدة المحدَّدة المصير والتي تتصف بقدرة محدودة على التكاثر وذات كفاءة ضيّقة في التمايز، وهي تُعرَف أحياناً باسم خلايا المُكاثِرة الانتقالية (الشكل 1). وفي الحالات التي تشتمل على مسار تمايزي واحد فقط، مثل البشرة بين- الجريبية، فإن الوظيفة الرئيسة لهذه الجماعة الانتقالية هي زيادة عدد الخلايا المتمايزة الناتجة عن كلّ انقسام للخلية الجذعية. هذا يعني أن الخلية الجذعية، ورغم قدرتها الكبيرة على التجدّد الذاتي، قد لا تنقسم في الواقع إلّا بشكل قليل التواتر نسبياً.

تقليدياً، تمّت دراسة الخلايا الجذعية للثدييات في الأنسجة، مثل الدم والبشرة، حيث لا تنقسم الخلايا المتمايزة وتتصف بفترة حياة قصيرة. غير أن الخلايا الجذعية موجودةٌ أيضاً في أنسجة تخضع عادةً إلى تجدّد أو استبدال محدودين جداً، مثل الدماغ أو الكبد. وفي الأجنّة المبكرة يكون التجدّد الذاتي للخلايا الجذعية أقلّ أهميةً من المقدرة على إنشاء سلالات خلوية خاصّة، وتكمن المفارقة في أن التمايز بعينه هو السبب في كون الخلايا الجذعية الجنينية (ES) تولّد الخلايا الجذعية في أنسجة الشخص البالغ.

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Science*, Vol 287, 25 February 2000. ترجمة الدكتور عادل باكير - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

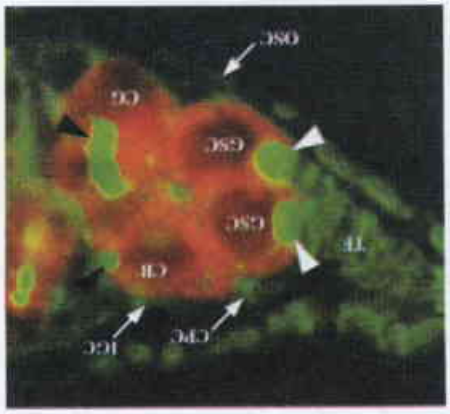


الشكل 1– نموذجان تبادليان لتطوّر الخلايا الجذعية. (**A**) اللاتناظر الثابت. خلية جذعية (S) تنقسم انقساماً لامتناظراً لتعطي سلفاً (P) يتضف بمقدرة أكثر محدودية على التكاثر ويتمايز مستجيباً لإشارات خارجية المنشأ. ويتم ضبط النمط الشكلي للخلايا الجذعية بواسطة نقل الإشارة المتبادل قريب و/أو بعيد المدى (الأسهم الثخينة الملوّنة). (**B**) لاتناظر الجماعات الخلوية. تعطي الخلايا الجذعية خلايا بنات يمكنها أن تكون إما خلايا جذعيةً أو خلايا سلفاً تتمايز من خلال مسارات مختلفة (1 و2 و3) وفقاً لتوليفة العوامل خارجية المنشأ التي تتعرّض لها. ECM = القالب الخلوي الخارجي.

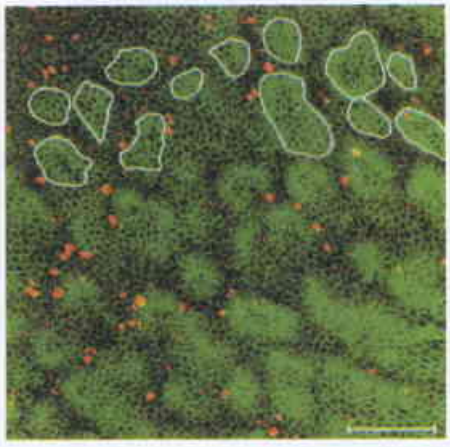
ويمكن أحياناً تمييز الخلايا الجذعية بشكلٍ دقيق جداً استناداً إلى شكلها أو تموضعها. ففي الغدة التناسلية والجهاز العصبي المحيطي لذبابة الخل Drosophila مثلاً، يكون لِبنات الخلايا الجذعية وغير الجذعية وجهةٌ محددةٌ جيداً بالنسبة للخلايا المحيطة [4] (الشكل 2). غير أن مكان الخلايا الجذعية في الكثير من الأنسجة الأخرى غير معروف إلّا بشكلٍ تقريبي، حيث تمّ تطوير العديد من الواسمات الجزيئية من أجل تحديد مقصورة الخلايا الجذعية أو أحواض تموضعها. وقد تعطي واسمات كهذه دلائل هامة عن كيفية التحكّم بالنمط الشكلي للخلايا الجذعية. فعلى سبيل المثال، تتصف الخلايا الجذعية في البشرة بمستويات عالية من التعبير عن بروتينات الإنتغرين بيتا1 integrin β1، ويؤدّي التصاقُ الخلية (المعتمِد على الإنتغرين بيتا1) بقالبها الخارجي إلى بدء تمايزها النهائي [6،5] (الشكل 3).

استراتيجيات التجدّد الذاتي للخلايا الجذعية وتمايزها

هناك استراتيجيّتان عامّتان تولّد الخلايا الجذعية عن طريقهما ذُرّيةً متمايزة [3]. ففي الحالة الحدّية الأولى، هناك آليات قد توصف بأنها ثابتة لا تتغير، تعطي بها خليةٌ جذعيةٌ، من خلال انقسام خلوي لا متناظر، خليةً



الشكل 2– الانقسام اللامتناظر الثابت في الجزء الأمامي من منبت الخلايا التناسلية لذبابة الخل، وهو عش الخلايا الجذعية للسلالة المُنشئة (GSC) في المبيض. تمّ تلوين المبيض بالأضداد anti-Hulitashao (بالأخضر) وanti-Vasa (بالأحمر). لاحظْ أن منبت الخلايا المُنشئة محاطٌ بخلايا غمدية خارجية (OSC بالأخضر). ويمكن تمييز خليتين جذعيتين للسلالة المُنشئة (GSC) بفضل السبكتروزوم الدائري الموجود في طرفهما الأمامي (رؤوس الأسهم البيضاء، بالأصفر)، كما تُعتبر هذه الخلايا عن البروتين Vasa (بالأحمر). والخلايا الجذعية للسلالة المُنشئة (GSC) محاطة بثلاث مجموعات من الخلايا الجسمية المتمايزة، وهي الخُيّط الطرفي (TF، بالأخضر) وخلايا القلنسوة (CPC، بالأخضر) والخلايا الغمدية الداخلية (IGC، بالأخضر). وتتموضع الخلية البنت المتمايزة للخلايا الجذعية للسلالة المُنشئة (GSC)، والمسمّاة بخلية الكيس الأرومي (cystoblast (CB، في الجزء الخلفي من الخلايا GSCs، وتحتوي أيضاً على سبكتروزوم دائري (رأس السهم الأسود العلوي، بالأصفر). وتتطوّر خلية الكيس الأرومي إلى الكيس (cyst CG) الذي يحتوي على فيوزوم fusome متفرّع (رأس السهم الأسود السفلي، بالأصفر) [4].



الشكل 3–لاتناظر المجموعات الخلوية في البشرة عند الإنسان. محضّر عام للبشرة بعد تلوينها بملوّن خاص بالإنتغرينات بيتا (B1 integrins) 1 (بالأخضر). لاحظ أن الخلايا الجذعية تتركّز ضمن التجمّعات الخلوية التي يكون فيها التعبير عن الإنتغرينات في أعلى مستوياته (والتي أُحيط بعضها بالأبيض). وهذه التجمّعات الخلوية مفصولةٌ عن بعضها البعض بخلايا مكاثِرة بشكل نشِط، (النوى إيجابية الـ Ki67 بالأحمر)، وبخلايا مكاثِرة انتقالية تتصف بمستويات أكثر انخفاضاً للإنتغرينات. شريط المقياس = 100 مكرومتر [5].

جذعيةً بنتاً واحدة وخلية بنتاً أخرى تخضع للتمايز (الشكل 1 A). وهناك أمثلةٌ كثيرةٌ عن ذلك لدى المتعضيات وحيدة الخلية واللافقاريات (مثلاً مبيض ذبابة الخل) (الشكل 2).

أما في الحالة الحدّية الأخرى (الشكل 1B والشكل 3)، فهناك آليات تحكّم عالية المستوى تولّد بها خليةٌ جذعيةٌ خلايا بناتٍ لديها احتمال معيّن في أن تصبح إمّا خلايا جذعيةً أو خلايا سلف progenitor محدَّدة المصير. وتقع غالبية الأنسجة ذاتية التجدّد عند الثديّات ضمن هذه الفئة. وفي الحالة المستقرة، ينتج عن كلّ انقسام لخلية جذعية، وسطياً، خليةٌ جذعية واحدة بالإضافة إلى خليةِ بنتٍ واحدة محدَّدة المصير، غير أن تحقيق اللاتناظر يتم بالأحرى على أساس الجماعات الخلوية وليس على مستوى الانقسامات الخلوية الفردية. علاوة على ذلك، فقد يكون هناك في بعض الأنسجة طيفٌ متصل من السلوك الخلوي، حيث تقع الخلايا الجذعية والخلايا السلف على الطرفين المتقابلين من الطيف بدلاً من وجود جماعات منفصلة من الخلايا الجذعية والخلايا السلف [6،5].

رغم كون هاتين الاستراتيجيتين مختلفتين كثيراً في الآلية، فإن كلاً منهما يشتمل على آليات تحكّم راجع متعدّدة وعلى تأثرات متبادلة ما بين الخلايا. إنّ لاتناظر الجماعات الخلوية يسهّل الاستجابة إلى الحاجات الفيزيولوجية المتبدّلة، كما هو الحال عندما تزداد الحاجة إلى إنتاج الخلايا الدموية أو البشرية بعد التعرّض للجروح. ومع ذلك، فقد تبيّن أن هناك كفاءة مرنة في الاستراتيجية اللامتغيّرة، وهو ما أثبتته التجارب التي تستخدم التعبير الخارجي لعوامل ضبط داخل الخلايا البنات غير الجذعية [4].

آليات التحكّم داخلية المنشأ في تقرير مصير الخلايا الجذعية

يعتمد الحفاظ على مقصورة الخلايا الجذعية في النهاية على عوامل ضبط ذاتية للخلايا تعدّلها إشاراتٌ خارجية. وتشتمل مثل عوامل الضبط داخلية المنشأ هذه على البروتينات المسؤولة عن إعداد الانقسامات الخلوية اللامتناظرة، وعلى عوامل نووية تتحكّم بالتعبيرية المورّثة وبإجراء التعديلات على الصبغيات في بنات الخلايا الجذعية وغير الجذعية، وعلى ميقاتيّات ربما تحدّد عدد دورات الانقسام لدى جماعة خلايا المكاثرة الانتقالية.

التوزيع اللامتناظر للمحدّدات الخلوية

أثناء الانقسام الخلوي اللامتناظر، قد تكتسب الخليّتان البنتان إمكانيات تخلّقية مختلفة، إمّا بالتوزيع غير المتساوي لمحدِّدات تُقرّر مصير الخلية، أو بسبب عوامل مؤثّرة تفريقية آتية من البيئة المحيطة. وللبروتينات البنيوية، خصوصاً مكوّنات الهيكل الخلوي، أهميةٌ كبيرة في توزيع المحدِّدات التي تقرّر مصير الخلية.

وفي الجهاز العصبي المحيطي لذبابة الخل، يتم التحكّم بالانقسامات اللامتناظرة للخلية الطليعية للعضو الحسّي بواسطة نظام هرمي من المورّثات، أحداها هي المورّثة inscuteable (insc) [4]. ويقوم البروتين Insc بتنسيق ثلاثة مظاهر للانقسام اللامتناظر على الأقل، وهي التموضع اللامتناظر لمحدِّدات مصير الخلية المرتبطة بالأغشية، بما في ذلك البروتين Numb، والتموضع اللامتناظر لِـ RNA الرسول (mRNA)، وتوجيه مغازل الانقسام الخلوي. وتحتوي المنطقة المركزية من البروتين Insc على بعض التماثُل Homology مع مكرّرات بروتين الأنكيرين ankyrin repeats، كما أن البروتين Insc ضروريٌ لتوجيه المغزل الانقسامي وتثبيت البروتين Numb في مكانه الصحيح. ويعتمد التموضع اللامتناظر للبروتين Insc في الخلايا الطليعية العصبية المنقسمة على الخيوط الدقيقة microfilaments للهيكل الخلوي الأكتيني.

وفي مبيض ذبابة الخل، تخضع كلّ خلية جذعية إلى انقسامات لامتناظرة لتعطي خليةً جذعية تبقى مرتبطةً مع الخلايا الجسمية للخيط الطرفي القاعدي، وخليةً بنتاً متمايزة يتم ترحيلها من العش لتتطور وتتحول في النهاية إلى بيضة ناضجة (الشكل 2). وتشتمل الآلية ضمن الخلوية التي تتحكّم بتوجيه الانقسام اللامتناظر للخلية الجذعية على عُضيّة سيتوبلازمية تُسمّى بالسبكتروزوم spectrosome تحتوي على بروتينات غشائية هيكلية وضابطة متنوعة، مثل السبكترين والسّيكلين A، على الترتيب. ويقوم السبكتروزوم بإرساء المغزل الانقسامي من أجل تحديد وجهة انقسام كلّ خلية جذعية بالنسبة لوضعية الخيط الطرفي، وقد يقوم أيضاً بتثبيت مكان جزيئات هامة لتحديد مصير الخلية الجذعية من أجل الاحتفاظ بها بشكل انتقائي في الخلية الجذعية البنت [4].

عوامل الانتساخ. رغم اكتشاف مورّثات موجودة عند الفقاريات مماثلة لمورّثات تتحكّم بلاتناظر انقسامات الخلايا الجذعية عند ذبابة الخل، فليس من الواضح بعد ما إذا كان لهذه المورّثات أدوارٌ مشابهة في تحديد مصير الخلايا الجذعية. ولكنّ هناك الكثير من الدلائل على أن عوامل الانتساخ transcription factors تتحكّم في تحديد مصير الخلايا الجذعية. ففي عملية تشكيل الدم مثلاً، ثَبُت تورّط عدد كبير من عوامل الانتساخ شديدة الانحفاظ التطوّري [7]. أحد هذه العوامل هو البروتين SCL/Tal-1 الذي يتم تنشيطه خارجياً في الكثير من حالات ابيضاض الدم الحادة المتعلقة بالخلايا اللمفاوية التائية، وهو أساسيّ لتشكيل جميع السلالات الخلوية الدموية عند الفأر. وقد تمّ اكتشاف عوامل انتساخ أخرى تقتصر وظائفها على أنواع معيّنة من السلالات المتمايزة. ويتم التحكّم بكلّ سلالة خلوية بواسطة توليفة فريدة من عوامل الانتساخ التي قد يُعبَّر عن كلّ واحد منها بشكل منفرد في عدة سلالات خلوية. وفي بعض الحالات، تتضمن هذه التوليفات تشكيل معقّدات فيزيائية [7].

لقد أظهرت الأبحاث الحديثة على البشرة والنسيج الظهاري المعوي أهمية عائلة عوامل الانتساخ المسمّاة Tcf/Lef. فالفئران المتماثلة اللواقح والمعدومة المورّثة Tcf4 تفتقر إلى الخلايا الجذعية في المعي الدقيق، في حين تتصف الفئران الطافرة Lef1 المتماثلة اللواقح بعيوب في تشكيل الشعر والشوارب [8]. ويقوم بروتين البيتا- كاتينين β-catenin بتنشيط الانتساخ المعتمد على العوامل Tcf/Lef، ويكون وجوده أكثر غزارةً في الخلايا الجذعية البشرية منه في خلايا المكاثرة الانتقالية. إن الإفراط في التعبير عن شكلٍ أكثر استقراراً لهذا البروتين يزيد نسبة الخلايا الجذعية في الزجاج، كما أنه يؤدي في الحي إلى ارتداد الخلايا الكيراتينية إلى حالة متعدّدة القدرات تستطيع فيها التمايز لتعطي جريبات شعرية أو بشرة بين- جريبية، حيث ستتطور بعض هذه الجريبات إلى أورام [9]. وبالمقابل، فإن الإفراط في التعبير عن بروتين البيتا- كاتينين في النسيج الظهاري المعوي للفئران المحوّرة وراثياً يحضّ على تكاثر الخلايا، ولكنْ لا تُلاحَظ أية زيادة صافية في عدد الخلايا بسبب وجود زيادة موازية في الموت الخلوي المبرمَج [10].

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الميقاتيّات. بعد أن تغادر الخلية مقصورةَ الخلايا الجذعية، ما الذي يحدّد عدد دورات الانقسام التي تخضع لها قبل التمايز النهائي؟ لقد تركّز الاهتمام على الدور المحتمل لميقاتيّات دارات ضمن – خلوية تتحكّم بالتغيّرات في مستوى محضّضات أو مثبطات الدارة الخلوية [11]. وكمثال على المحضّضات، نذكر هنا البروتين cul-1 عند الدودة Caenorhabditis elegans الذي يشارك في تحطيم بروتينات خاصة بالتحكّم بالدارة الخلوية مثل السيكلينات G1 cyclins G1. وكمثال على المثبطات، نذكر البروتين p27/Kip1 (p27) المثبّط لـ: CDK، والذي يتراكم كجزءٍ من آليةٍ توقيت تحدُّ من تكاثر طلائع الخلايا قليلة التغصّنات oligodendrocyte عند الجرذ وتحضّ على تمايزها.

وآلية التوقيت الثالثة المحتملة هي طول التيلومير (telomere). (الجزء الطرفي من الصبغي) ففي معظم الأنسجة البشَرية، يكون نشاط أنزيم التيلوميراز telomerase منخفضاً أو غير قابل للكشف. وقد يلعب التقاصر المتدرّج للتيلوميرات دورَ ميقاتيةٍ انقسامية، وذلك بقيامها بتقليل عدد الانقسامات قبل الشيخوخة. وقد لا تخضع الخلايا الجذعية للشيخوخة بسبب النشاط الدائم لأنزيم التيلوميراز [12]. وتتّصف فئران الجيل الأول البالغة المحوّرة العديمة التيلوميراز بتشكّل طبيعي للدم، ولا تشكو من عيوب في الخِصى أو المعي أو البشرة. ولكن لدى الجيل السادس تظهر عيوب في التجدّد بعيد المدى للخلايا الجذعية المشكّلة للدم، كما تصبح ذكور الفئران عقيمةً، وتشكو الفئران من تساقط الشعر والتأخير في إعادة تغطية الجروح بالنسيج الظهاري [12]. هكذا، ورغم أن الميقاتية المعتمِدة على التيلوميراز قد لا تتحكّم بجماعات الخلايا السلف أثناء فترة الحياة الطبيعية للفأر، فإن مثل هذا الدور قد يكون ذا أهمية عند الثدييّات التي تعيش لفترات أطول مثل الإنسان.

آليات التحكّم خارجية المنشأ: عش الخلايا الجذعية

يشكّل مجموع الإشارات الخارجية التي تتحكّم في تقرير مصير الخلايا الجذعية الوسطَ الدقيق لهذه الخلايا، أو ما يُسمّى بالعش [3]. ولهذا العش أهمية كبيرة سواء في الأنسجة ذات الجماعات الخلوية اللامتناظرة أو الأنسجة ذات اللاتناظر الثابت، وهو يشتمل على تفاعلات معقّدة لإشارات قصيرة وبعيدة المدى يتم تبادلها ما بين الخلايا الجذعية وبناتها الخاضعة للتمايز والخلايا المجاورة (الشكل 1).

العوامل المُفرَزة. لقد نشأ مفهوم العش لأول مرة من خلال دراسة تشكّل الدم، حيث اتّضح أن المنظومات المخبرية في الزجاج التي تدعم تكاثر وتمايز وبقاء جماعات خلوية سلف مولّدة مميّزة، تعتمد على عوامل تفرزها أنماطٌ أخرى من الخلايا [3، 13] ويبدو أن الوظيفة الأولية للعوامل المُفرَزة في هذه المنظومة هي وظيفةٌ انتقائية، وذلك لمنع موت الخلايا السلف التي سبق تقرير مصير سلالتها والتي تمّ توليدها بشكل عشوائي [3، 7، 14] وبالمقابل، تلعب العوامل المُفرَزة دوراً تقريرياً أثناء تمايز الخلايا الجذعية للعرْف العصبي [15].

وتقوم تشكيلة واسعة من العوامل المُفرَزة بضبط تكاثر الخلايا الجذعية وتقرير مصيرها. وهناك عائلتان من البروتينات، وهما TGFβs وWnts، تُظهِران انحفاظاً وظيفياً لافتاً ما بين الأنواع، وكذلك انحفاظاً ما بين الأنسجة التي تجدّد نفسها ذاتياً من خلال انقسامات خلوية لامتناظرة أو من خلال لاتناظرٍ في الجماعات الخلوية. وتقوم البروتينات Wnts بتنشيط الانتساخ من خلال مسارٍ معقّد يتضمّن البيتا- كاتينين [16]. ورغم من ثبوت أهمية هذا المسار الموصوف أعلاه في بشرة الثدييّات والنسيج الظهاري المعوي، إلّا أن مصدر البروتينات Wnts في هذه الأنسجة لا يزال غامضاً جداً [9، 10]. وعند الدودة C. elegans، يتطلّب الانقسام اللامتناظر للخلية الأرومية الجنينية EMS blastomere إشارةَ تحريض بالبروتين Wnt من الخلية الأخت تتحكّم في كلٍ من توجيه المغزل الانقسامي وخصائص الأدمة الداخلية [4]. وهناك على الأقل عضوان اثنان من عائلة بروتينات التأشير TGFβ لهما أهمية في ضبط تمايز الخلايا الجذعية للعرْف العصبي [15]. أما عند ذبابة الخل، فالبروتين Decapentaplegic (Dpp)، المماثل للبروتين Bmp2/4، ضروريٌ من أجل الحفاظ على الخلايا الجذعية للسلالة التناسلية الأنثوية وتنشيط انقسامها [4].

التأثرات بين – الخلوية المعتمِدة على البروتينات الغشائية المتكاملة. رغم أن العوامل المُفرَزة تستطيع التأثير على مدى أضعاف عديدة لقطر الخلية، إلّا أنّ هناك إشارات أخرى تتحكّم بمصير الخلايا الجذعية تتطلّب تماساً مباشراً ما بين الخلايا. ومع أن البيتا- كاتينين هو جزءٌ بنيوي من نقاط الاتصال الالتصاقية (adherens) [9، 10، 16] ما بين الخلايا، فمن الغريب أنه لا يُعرَف إلّا النزر القليل عن اللّصوقية بين الخلوية كآلية ضبط للخلايا الجذعية. ومع ذلك، فهناك مثالٌ ممتاز على نقل الإشارة الموضعي المعتمد على التماس المباشر ما بين الخلايا، متمثّلاً بالمستقبلة Notch وربيطتها Delta، وكلاهما بروتينات عابرة للغشاء [17]. وعند ذبابة الخل، تحتاج ذُرّية الخلية الطليعية للعضو الحسّي إلى نشاط البروتين Notch من أجل تحديد مصيرها الصحيح. ويبدو أن البروتين Numb يحوّر التأثر بين-الخلوي المعتمد على Notch أثناء كل انقسام خلوي ضمن سلالة العضو الحسّي، وذلك عن طريق تثبيط نشاط Notch بحيث يصبح التأثر بين-الخلوي لامتناظراً. وهكذا نجد أن هناك آلية داخلية المنشأ (تتضمّن Numb) وأخرى خارجية المنشأ (تتضمّن Notch) تتكاملان مع بعضهما البعض للتحكّم في تقرير مصير الخلية [4]. ويتبيّن أن نقل الإشارة المعتمِد على Notch هو أيضاً ذو أهمية في النسج الجنينية والبالغة عند الفقاريات، بما في ذلك النسيج الظهاري العصبي للشبكية، والعضلات الهيكلية والدم [17].

الإنتغرينات والركازة الخارج–خلوية. يتم تأمين التصاق الخلية بالركازة الخارج–خلوية بواسطة عدة صفوف من المستقبلات، والتي تُعدّ الإنتغرينات أفضلَها توصيفاً. إن مستوى التعبير العالي عن الإنتغرينات β1 ضروريٌ للحفاظ على الخلايا الجذعية في البشرة، وتقوم الإنتغرينات β1 أيضاً بضبط تمايز الخلايا الكيراتينية وأنماط أخرى من الخلايا من خلال نقل الإشارة المعتمد على الكيناز MAP [5، 6]. وتقوم الإنتغرينات بتثبيت الخلايا في مكانها الصحيح ضمن النسيج، كما يضمن فقدان التعبير عن الإنتغرينات أو التعديل فيه نزوحَ الخلايا من عش الخلايا الجذعية لتمر بالتمايز ثم لتموت في النهاية موتاً خلوياً مبرمجاً[5، 6، 13]، وهي كذلك مستقبلاتٌ ناقلة للإشارة بحدّ ذاتها وتستطيع تنشيط مستقبلات عوامل

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

النموّ بشكل مباشر [18]. وتستطيع بروتينات الركازة الخارج- خلوية تعديل التعبير عن الإنتغرينات β1 والتأثير في نشاطها، وقد تلعب التغيّرات الموضعية في تكوين الغشاء القاعدي دوراً في تثبيت توزّع الخلايا الجذعية الظهارية والحفاظ عليه، كما هو الحال في محور زغابات خبايا crypt villus axis المعي الدقيق [19]. وختاماً، يمكن للركازة الخارج-خلوية عزل العوامل المُفرَزة وتعديل تركيزها الموضعي ضمن عش الخلايا الجذعية [3، 13، 16].

آليات التحكّم بالاستتباب

حسب نموذج العش في صياغته الأصلية [3]، ساد الاعتقاد أنه عندما تنقسم الخلية الجذعية تبقى خلية واحدة فقط في العش، في حين تُضطرّ الأخرى إلى التمايز ما لم يتوفّر لها عشٌّ آخر. وفي الأنسجة ذات الانقسامات اللامتناظرة الثابتة، من السهل أن نفهم كيف تتم هندسة النزوح من العش بواسطة توجيه المغزل الانقسامي. ولكن بالنسبة لجماعات الخلايا الجذعية ذات النمط الضبطي regulatory type، تبدو فكرة التنافس على عش الخلايا الجذعية مفرطةً في التبسيط دون شكّ. فمثلاً، عندما تُزدرَع خلايا جذعية مشكّلة للدم من فأر إلى آخر، يتم تحديد النمط الظاهري النهائي للطعم ببساطة من خلال نسبة الخلايا الجذعية للحيوان المضيف إلى الخلايا الجذعية للحيوان المعطي، وهو ما يوحي بأنه ليس هناك حاجة إلى استنفاد مقصورة الخلايا الجذعية لإفساح المكان للخلايا الجذعية المُضافة الجديدة [13].

وهناك الكثير من الأمثلة على الخلايا الجذعية أو ذُرّيتها المتمايزة التي تضبط عدد الخلايا الجذعية [3، 5، 6، 13] عن طريق آليّات تعتمد، على الأقل في جزءٍ منها، على دارات تحكّم راجع إيجابي وسلبي حُفِظَت عبر التطوّر [4، 20]. ويمكن لآليّات التحكّم الراجع أن تشتمل على عوامل الانتساخ النوعية التي يتم تحريضها كاستجابة لإشارة خارجية، أو على التأثيرات المعاكسة لإشارات خارجية مختلفة.

اللدونـــة

هناك أدلّة متزايدة على أن بعض مجموعات الخلايا الجذعية المعزولة من أنسجة بالغة يمكنها أن تُظهِر لدونةً (مرونة) لافتة عند ازدراعها في أشخاص متلقّين [2]. وفي أغلب الأحوال، تكون النسج التي تساهم فيها خلايا المعطي قريبةً جنينياً من الأنسجة التي اشتقّت منها هذه الخلايا. وهناك شَبَه لهذه الملاحظة بالظاهرة المدروسة جيّداً، وإن كانت نادرة، والمعروفة بالتمايز الانتقالي أو التحديد الانتقالي [21]. ولكن في بعض الحالات، مثلاً عندما تعطي الخلايا الجذعية العصبية خلايا دموية، فإن هذه العلاقة المفترَضة تهتزّ. ولا يسَعُنا حالياً إلّا التخمين بصدد الآليّات التي تساهم في مثل هذه التبدّلات الهائلة في مصير الخلية. وهناك فكرة نابعة من ملاحظتين اثنتين على منظومة تشكيل الدم. أولاً، أظهرت دراساتٌ أُجريت على خلايا منفردة باستخدام الانتساخ العكسي وتفاعل البوليميراز المتسلسل PCR أن الخلايا المفردة الجذعية أو السلف تعبّر بشكل متزامن، وقبل تقرير مصيرها، عن مورّثات مختلفة مرتبطة بسلالات خلوية، مما يوحي بأن تحديد واختيار مسار سلالة معيّنة يكون مسبوقاً بمرحلة استهلالية تُخلَط فيها الأوراق وتقوم فيها الخلية بتنشيط مورّثات مرتبطة بعدّة سلالات خلوية مختلفة[7، 14] ثانياً، عندما يتم تعطيل تمايز الخلايا اللمفاوية البائية باستئصال المورّثة Pax5، فإن سليفات الخلايا البائية تستطيع أن تتمايز لتعطي طيفاً واسعاً من الأنماط الخلوية الأخرى المشكّلة للدم [22]. هكذا، وبعد ازدراع الخلايا الجذعية، فإن سلفاً نادراً غير محدَّد المصير قد يكون قادراً على القيام بالتمايز الانتقالي أو إعادة برمجة نفسه إذا وجد نفسه في عش جديد للخلايا الجذعية. وهناك عدة عوامل قد تعزّز هذا الاحتمال. مثلاً، قد تكون قدرة الخلية على الاستجابة إلى إشارات التمايز قابلةً للحثّ بواسطة الخلايا المجاورة التي تخضع للتمايز في الوقت ذاته وفي بعض الأحيان معتمدةً عليها [23]. بالإضافة إلى ذلك، فإن استئصال خلية جذعية أو سلف من مجتمع الخلايا المجاورة لها والتي تخبرها بما يجب عليها أن تفعله، قد يؤدّي بها إلى ضبط فائق، أو إعادة التعبير عن، أو إعادة تنشيط مستقبلات سطحية تستجيب لطَيفٍ واسع من عوامل نقل الإشارة، والتي يوجد بعضٌ منها في العش الجديد.

الخلايا الجذعية الجنينية : حاضرها ومستقبلها

تُشتقّ سلالات الخلايا الجذعية المتعدّدة القدرات، والمعروفة أيضاً بالخلايا الجذعية الجنينية (ES)، بشكل روتيني من الأكياس الأرومية blastocysts عند الفأر. وعند إعادة غرسها في أكياس أرومية مضيفة، تساهم هذه الخلايا في جميع أنسجة الحيوان البالغ، بما في ذلك الخلايا التناسلية [24]. ورغم استخداماتها الواسعة، فمن الغريب أنه لا يُعرف إلّا القليل عن منشئها، وعلى وجه الخصوص، لا يُعرف ما إذا كانت جميع خلايا كتلة الخلايا الداخلية ICM inner cell mass و/أو الأرومة السطحية epiblast قادرة على تأسيس سلالات خلوية جنينية [25]. ويعتمد التشكيل البدئي لكتلة الخلايا الداخلية (ICM) على الانقسام اللامتناظر لخلايا مستقطَبة للتويتة morula المتكتّلة [25]، غير أن المورّثات التي تتحكّم بهذه الانقسامات لا تزال مجهولة الهوية. ولكن من الواضح أن عامل الانتساخ Oct4، الحاوي على الجزء البروتيني POU، يلعب دوراً أساسياً في توليد خلايا كتلة الخلايا الداخلية (ICM). ولا تتطوّر الأجنّة المعدومة المورّثة Oct4 إلى أبعد من مرحلة الكيس الأرومي، كما تقوم الخلايا الداخلية، وبدلاً من تمايزها إلى كتلة الخلايا الداخلية، بالتعبير عن واسمات خاصّة بالأرومة المغذّية trophoblast.

يتم توفير العش الخاص بالأرومة السطحية المتعدّدة القدرات في الحي بواسطة النسج الخارج جنينية، وهي الأدمة الخارجية ectoderm المشتقّة من الأرومة المغذّية، والأدمة الداخلية endoderm البدائية أو الحشوية [27]. وتُفرز الأدمة الداخلية الحشوية الأمامية إشارةً متعلّقة بالبروتين TGFβ، وهي البروتين nodal الذي يتحكّم بتمايز غالبية السلالات الخلوية الجنينية الأمامية، في حين يتم تحريض سلالات خلايا الأدمة المتوسّطة البطنية ventral mesodermal والخلايا المُنشِئة بواسطة البروتين Bmp4 الذي تنتجه الأرومة المغذّية. إن ملاحظات كهذه تمدّنا بدلائل هامة عن الطريقة التي يجب علينا اتّباعها في قيادة الخلايا الجذعية الجنينية (ES) عبر مسارات تمايز تعطينا بها سلالات خلوية مختلفة من خلال المستنبتات الخلوية المسيطَر عليها في الزجاج، وهو ما يشكّل عنصراً أساسياً في التطبيقات العلاجية لهذه الخلايا [28].

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

ورغم أن عامل تثبيط ابيضاض الدم يحفّز التجدّد الذاتي للخلايا الجذعية الجنينية الفأرية في المستنبتات الخلوية، فإن هذا العامل لا يتصف بالخاصية نفسها بالنسبة للخلايا الجذعية البشَرية المتعدّدة القدرات [1]، وهو ما يبيّن فقط أحد الأسباب التي تجعل من مقارنة خصائص الخلايا الجذعية الجنينية (ES) الفأرية والبشَرية أمراً هاماً. وبفرَض أن هناك عدداً قليلاً نسبياً من مسارات نقل الإشارة المتحكّمة بالتجدّد الذاتي وبالنمط الشكلي المتعدّد القدرات، فهل يمكن لهذه المسارات أن تُنشَّط بشكل مؤقّت في الخلايا الجذعية البالغة، مع مقدرة أكثر تقييداً على إطلاق العنان لتعدّد القدرات كحالةٍ مستقرة؟ وقد يشكّل دمج الخلايا البالغة مع خلايا عديمة النوى Cytoplast خلايا كتلة الخلايا الداخلية (ICM) أو الخلايا الجذعية الجنينية (ES) طريقةً أخرى لتحقيق هذا الهدف، مما يتيح وسيلةً بديلة في تحضير السلالات الخلوية الجذعية البشَرية المتعدّدة القدرات انطلاقاً من الأكياس الأرومية [30]. ولقد أصبح من الممكن الآن إعادة تنشيط حالة التجدّد الذاتي وتعدّد القدرات لبعض الخلايا المتمايزة في الأجنّة المبكرة. مثلاً، يمكن تحريض خلايا الأدمة الداخلية للكيس المحي عند الفأر والجرذ لتتمايز انتقالياً وتعطي خلايا متعدّدة القدرات في الحي [31]، كما تعطي الخلايا الأصلية المُنشِئة الفأرية والبشَرية خلايا متجدّدة ذاتياً ومتعدّدة القدرات عند استنباتها في وسط يحتوي على خليط من عوامل نقل الإشارة [1، 32].

إن الخلايا الجذعية المتعدّدة القدرات ليست السلالات الخلوية الوحيدة التي يمكن اشتقاقها من أجنّة الثدييات المبكرة. فقد تمّ اشتقاق سلالات خلايا جذعية أرومية مغذّية من أجنّة فأرية مبكرة، وسوف تكون للسلالات المقابلة لها عند الإنسان قيمة عظيمة بإعطائنا معلوماتٍ هامة تفيد في فهم تعشيش الجنين والتأثرات ما بين الأم والجنين [33]. ويمكن للأدمة المتوسطة لأجنّة الفأر في طور تشكّل المُعَيدة (gastrulation) أن تعطي مستنبتات طويلة الأمد من الخلايا السلف للبطانة ضمن الجنينية [34]، وهذا اكتشافٌ هام باعتبار أن بعض الأوعية الدموية الرئيسة هو مكانُ تشكّل الدم في الأجنّة الفأرية والبشَرية المبكرة. وقد استُخدمت الأجنّة البشَرية (بعمر 3 إلى 8 أسابيع) في تمييز واستنبات الخلايا المشكّلة للدم المتعلّقة بالأوعية الدموية داخل الجنين. إن البساطة النسيجية لهذه المناطق مقارنةً بنقي العظم تجعل منها نماذج ممتازة لفهم العش الذي تتولّد فيه الخلايا الجذعية المشكّلة للدم.

بالنسبة لبعض المنتقدين، فإن تحصيل معرفة كهذه واشتقاق الخلايا الجذعية البشرية المتعدّدة القدرات لا يحقّق فائدة ترجى، فليس لهذه الخلايا عودة إلى "جنّة عدْن" بعد أن هبطت منها. أما بالنسبة لآخرين، فإن دراسات كهذه، إن أُجريت وفقاً لمناهج مناسبة، تفتح آفاقاً واسعة، ليس فقط لاكتشافات غير متوقّعة في البيولوجيا، وإنّما في النهاية لتخفيف معاناة البشر.

المراجع REFERENCES

[1] J. A. Thomson et al., Science 282, 1145 (1998); M. J. Shamlott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13726 (1998).

[2] C. B. Johansson et al., Cell 96, 25 (1999); F. Doetsch L. caille, D. A. Lim. J. M. Garcia - Verdugo, A. Alvarez - Buylla, Cell 97, 703 (1999); C. R. R. Bjornson, R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, A. L. Vescovi, Science 283, 534 (1999); M. A. Eglitis and E. Mezey, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A, 94:4080 (1997); B. E. Petersen et al., Science 284, 1168 (1999); G. Ferrari et al., Science 279, 1528 (1998); M. F. Pittenger et al., Science 284,143 (1999).

[3] C. S. Potten, Ed., Stem Cells (Academic Press, London, 1997); P. A. Hall & F. M. Watt, Development 106, 619 (1989); S. J. Morrison et al., Cell 88, 287 (1997).

[4] Y. N. Jan & L. Y. Jan, Nature, 392, 775 (1998); B. Lu, L. Y. Jan, Y. N. Jan, Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 392 (1998); H. Lin, Curr. Opin. Cell. Biol. 10: 687 (1998); T. Xie and A. C. Spradling, Cell 94:251 (1998).

[5] U B. Jensen, S. Lowell, F. M. Watt, Development, 126: 2409 (1999).

[6] A. J. Zhu L; Haase, F. M. Watt, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 6728 (1999); P. H. Jones and F. M. Watt, Cell 73, 713 (1993); P. H. Jones S. Harper, F. M. Watt Cell 80, 83 (1995).

[7] M. A. Cross and T Enver Curr. Opin. Genet. Dev., 7, 609 (1997).

[8] V. Korinek et al., Nature Genet., 19 ,379 (1998); C. van Genderen et al., Genes. Dev., 8, 2691 (1994).

[9] U. Gat R. DasGupta, L. Degenstein, E. Fuchs, Cell 95, 605 (1998). A. J. Zhu and F. M. Watt, Development 126, 2285 (1999).

[10] M. H. Wong B. Rubinfeld, J. I. Gordon, J. Cell Biol. 141, 765 (1998).

[11] Clocks: I. Conlon and M. Raff, Cell 96:235 (1999).

[12] Telomerase: M. Greaves, Trends Genet. 12, 127 (1996); H. W. Lee et al., Nature, 392, 569 (1998); K. L. Rudolph et al., Cell 96, 701 (1999).

[13] P. J. Quesenberry and P. S. Becker, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S .A, 95, 15155 (1998).

[14] T. Enver and M. Greaves, Cell 94,9 (1998).

[15] N M. Shah A. K. Groves, D. J. Anderson, Cell 85, 331 (1996). L. Lo, L. Sommer, D. J. Anderson, Curr. Biol. 7, 440 (1997).

[16] M. Peifer, Nature, 400, 213 (1999).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[17] S. Artavanis-Tsakonas M. D. Rand, R. J. Lake, Science 284, 770 (1999); J. Lewis, Semin. Cell Dev. Biol. 9, 583 (1998).

[18] L. Moro et al., EMBO J. 17, 6622 (1998).

[19] M. Kedinger O. Lefebvre, I. Duluc, J. N. Freund, P Simon - Assmann, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 353, 847 (1998).

[20] N. Perrimon and A. P. McMahon, Cell 97, 13 (1999). S. Dyson and J. B. Gurdon, Cell 93, 557 (1998).

[21] Transdetermination: G. Eguchi and R. Kodama, Curr. Opin. Cell. Biol., 5, 1023 (1993); J M. W. Slack,J. Theor. Biol. 114, 463 (1985).

[22] S. L. Nutt B, Heavey, A. G. Rolink, M. Busslinger, Nature, 401, 556 (1999).

[23] Community effect: J. B. Gurdon, Nature, 336, 772 (1988).

[24] A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow - Newerly, J. C. Roder, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 90, 8424 (1993); F. A. Brook and R. L. Gardner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 94, 5709 (1997).

[25] T. P. Fleming and M. H. Johnson, Annu. Rev. Cell Biol. 4, 459 (1988).

[26] J. Nichols et al., Cell 95, 379 (1998).

[27] R. S. P. Beddington and E. J. Robertson, Cell 96, 195 (1999).

[28] K. S. O'Shea, Anat. Record (New Anat.), 257, 32 (1999).

[29] H. Niwa T. Burdon, I. Chambers, A. Smith, Genes Dev. 12, 2048 (1998).

[30] Pluripotent embryonic germ cells can reprogram somatic cells in hybrids: M. Tada T. Tada L. Lefebvre, S. C. Barton, M, A. Surani EMBO J., 16, 6510 (1997).

[31] Transdifferentiation of embryonic cells into pluripotent cells: H. Sobis and M. Vandeputte, Dev. Biol., 92, 553 (1982).

[32] Y. Matsui K. Zsebo, B. L. M. Hogan, Cell, 70, 841 (1992).

[33] Trophoblast cell lines: S. Tanaka, Science 282, 2072 (1998).

[34] Intraembryonic hematopoiesis: A. K. Hatzopoulos J. Folkman, E. Vasile, G. K. Eiselen, R. D. Rosenberg, Development, 125, 1457 (1998). T. North et al., Devlopment, 126, 2563 (1999); M. Tavian, Devlopment 126, 793 (1999).

[35] We thank, Y. Furuta For Fig. 1, T. Xie and A. Spradling For fig. 2, and everyone who commented on the manuscript.■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

لماذا الخلايا الجذعية؟*

د. فاندر كوي
قسم علم التشريح والبيولوجيا الخلوية - جامعة تورنتو - كلية الطب - كندا.
س. فايس
قسم البيولوجيا الخلوية وعلم التشريح - جامعة كلاغاري - كلية الطب - كندا.

ملخّص

تعالج هذه الورقة الخلايا الجذعية من حيث وظيفتها، ونشوؤها، وتطورها والمسببات. وعلى عكس ما يتبادر للذهن فإن معظم الخلايا الجذعية يمكن أن تنشأ في مرحلة متأخرة من التطور الجنيني، لتعمل بشكل أساسي على تجديد الأنسجة، بحيث تؤمّن بذلك بقاءً مديداً للمتعضي. ومما يثير الدهشة هو ما تشير إليه تقارير حديثة من أن خلايا جذعية بالغة ونوعية النسيج، تمتلك المقدرة على المساهمة في إعادة تجديد العديد من الأنسجة البالغة.

الكلمات المفتاحية: خلية جذعية، الخلية السلف، الكيس الأرومي، الخلايا الجذعية المشكلة للدم، خيميرة، خلايا دبقية نجمية.

أفاد تنبرجين Tinbergen عالم سلوك الحيوانات الحائز على جائزة نوبل، في تفصيل منه لتأكيد سابق اقترحه ج. س. هكسلي J.S. Huxly، بوجود أربع طرائق مختلفة للإجابة عن أي سؤال يبدأ بـ"لماذا" في علم الأحياء وهي: كيف تؤدي الكينونة الحية وظيفتها في الوقت الحاضر؟ كيف تطورت؟ وكيف تتشكل؟ وما هي المسببات المباشرة التي تنظم سلوكها؟ [1]، تُعرف هذه الأسئلة باللغة الدارجة بأسئلة "لماذا" الأربعة التي سيتم التطرق إليها أدناه في سياق الخلايا الجذعية.

الوظيفة

يجب أن تُعرّف الخلايا الجذعية على أساس وظيفي. وحتى بعد أن أصبح بالإمكان تمييز خصائص بنيوية لخلايا جذعية على المستويين الشكلي والجزيئي (من بين الخصائص المرشحة لأن يكون للخلايا الجذعية دور فيها حالياً: مستوىً عالٍ من التعبير عن مورثة gene مسؤولة عن مقاومة العديد من العقاقير في آن واحد [2، 3] وبعض مجموعات تعبيرية الإنتغرينات integrin [4])، ستبقى دائماً وظيفتها المغرية كخلية جذعية هي الصفة المميزة لها.

وظيفياً، إن الخلايا الجذعية هي خلايا ذاتية التجدد، ذات مقدرة كامنة متعددة، وتقع في قمة الهرم الشلالي، وتتكاثر في الجسم الحي معطيةً أنماطاً خلوية متمايزة لنسيج ما. من المهم اقتصار تعريف الخلايا الجذعية المذكور آنفاً على خلايا مفردة تتصف أنها بمجرد تشكلها تستمر في تجديد ذاتها مدى حياة المتعضية، تمييزاً لها عن الأنماط الخلوية ذات الخلايا السلف (ذراري) العابرة (قدرتها على التجدد الذاتي محددة بعمر قصير) والتي توجد بشكل خاص لدى المتعضيات فائقة التعقيد. وقد يكون هذا أكثر من مجرد تصنيف لفظي، وذلك لأن كلاً من الخلايا الجذعية والخلايا السلف التي تتميز بالقدرة على التجدد الذاتي يمكن أن يكوّنا صفين مختلفين من الخلايا تحت ظروف تنظيم جزيئي مختلفة ضمن أي نسيج من الأنسجة. يمكن للخلايا الجذعية، في الجسم الحي للمتعضيات البالغة، أن تنقسم بشكل متكرر وذلك لإعادة تجديد نسيج ما، أو يمكن أن تكون أكثر سكوناً كما في نسيج الدماغ عند الثديّات [5]. وبدلاً من اعتبار الخلايا الجذعية على أنها خلايا غير متمايزة undifferentiated، قد يكون من المفيد النظر إليها على أنها خلايا متمايزة إلى حدٍّ يناسب أعشاش الأنسجة الخاصة بها [6]، مع توفر المقدرة لديها ربما، على إعطاء أنماط شكلية أخرى في أعشاش بديلة أخرى. يمكن للخلايا الجذعية أن تنقسم بشكل متناظر خلال عملية التشكل لتحقيق زيادة في عددها، كما يمكن لها أن تنقسم بشكل غير متناظر وذلك من أجل تجديد ذاتها وإعطاء أسلاف أكثر تمايزاً [7]. وبالفعل، وكما اقتُرح بالنسبة للخلايا الجذعية المكوِّنة للدم عند الثديّات، فإنّ تمايز أسلاف دموية نوعية من الانقسامات غير المتناظرة للخلايا الجذعية يمكن أن يكون عشوائياً [8]، في حين أنّ معدّل تكاثر الخلايا الجذعية هو فقط الذي يخضع لسيطرة آلية تنظيم محدّدة.

التطور

هل يجب أن نعدَّ أول خلية نشأت (متعضية وحيدة الخلية) خلية جذعية؟ إذا ما حاولنا تبسيط الأمور، فإن التساؤل السابق يختزل تكاثر المتعضية إلى مجرد كونه سلوك الخلية الجذعية. فالخلية التي تتجدد ذاتياً هي بالضرورة تُكاثِر ذاتها. ولدى المتعضيات وحيدة الخلية، يجب أن تمتلك هذه الخلية كلاً من القدرة على التجدد ذاتياً والقدرة على القيام بوظائف متمايزة. وقد طُرحت فكرة مشابهة بالنسبة للمتعضيات عديدة الخلايا البسيطة والتي تضم عدداً قليلاً نسبياً من الأنماط الخلوية، كما هو الحال عند الهيدرا Hydra، حيث يمكن إعادة تجديد الرأس والقدم عند الهيدرا البالغة بدءاً من قطعة من هيكل الجسم تمثل 2% فقط من كتلة الجسم الكلية. يبدو أنّ خلية ظهارية منفردة لدى الهيدرا تملك القدرة على

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Science*, Vol.287, 25 February 2000. ترجمة الدكتور إياد غانم - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

القيام بعدة أعمال وظيفية مستقرة بالإضافة إلى قيامها بدور الخلايا الجذعية [9]. يمكن النظر إلى الاكتشاف الذي تمّ حديثاً بأن الخلايا الجذعية العصبية الموجودة في منطقة الدماغ الأمامي للثدييّات التي تمتلك على الأقل بعض خصائص الخلايا الدبقية العصبية النجمية astrocytes المتمايزة على أنه مثال آخر على الخلايا الجذعية التي تقوم أيضاً بوظائف أنسجة بالغة متمايزة، حتى لدى المتعضيات الراقية [10].

مع أنّ معظم ما يتوفر من أدلة حتى الآن يشير إلى أن المتعضيات متعددة الخلايا تطورت بشكل منفصل عند الحيوانات عنها في النباتات، فقد قاد التماثل الذي وجد بين المورثة (بيوي piwi) التي تتحكم بالخلايا الجذعية المنشئة للخلايا الجنسية عند ذبابة الخل Drosophila، وبين المورثة (زويل zwille) التي تتحكم بالخلايا الجذعية المنشئة لخلايا الميرستيم الفارعي عند نبات الأرابيدوبسيس Arabidopsis، إلى الاستنتاج بأن خاصية "الجذعية stemness" تطورت في سلف وحيد الخلية مشترك بين النبات والحيوان، أو على الأقل أن النباتات والحيوانات اشتركت بسلف متعدد الخلايا [11]. لكن، ومع كل التنظير المتعلق بمسألة النشوء والترقي والمبني على التشابهات القائمة على تماثلية مورثة واحدة، هناك تفسيرات أخرى ممكنة مثل نقل المورثات عبر المملكة، أو من خلال الطريق الأكثر معقولية وهو التطور التقاربي من خلال انتقاء آليات كيميائية حيوية متشابهة في النباتات والحيوانات. على أية حال، من الممكن القول بأن النباتات لم تُعطَ حقها كمصدر لأبحاث الخلايا الجذعية. إذ أن خلايا منفردة من نبات بالغ كالجزر والتبغ تمتلك المقدرة على إنتاج نبات جديد كامل وبالغ.

بحسب التعريف الدقيق للخلايا الجذعية، الذي ينص على أن الخلية الجذعية بمجرد تشكلها، يجب أن تستمر بالتجدد الذاتي طيلة حياة المتعضية التي توجد بداخلها، فإنه من المستحسن اعتبار الخلايا الجذعية الافتراضية المشكلة لسلالة العصبونات الحسية عند ذبابة الخل على أنها خلايا سلف ذات مقدرة محدودة على التجدد الذاتي. يمكن تطبيق التعبير نفسه على الأقراص الافتراضية imaginal disks عند ذبابة الخل وعلى الخلايا الاحتياطية set aside عند البرمائيات المتحولة metamorphizing amphibians (وهي خلايا تبقى ساكنة عند اليرقات لتنشط لاحقاً وتعطي أنسجة المتعضية البالغة [14]). إن هذه الخلايا - بدلاً من كونها خلايا جذعية حقيقية - يمكن أن تمثل جماعات خلايا سلف انتقالية تمتلك وظائف محددة بمراحل تطورية بعينها. ربما تكون الخلايا المرستيمية البالغة التي تشكل أنسجة الأوراق والأزهار (تحت ظروف استنباتية)، هي أفضل شبيه للخلايا الجذعية المشكلة للأنسجة في الدم والدماغ والمعي والجلد عند الثدييّات. ولكن يتبقى علينا معرفة ما إذا كانت هذه الخلايا تمتلك صفات متشابهة فيما بينها.

التشكل

بالنسبة للتشكل عند الثدييّات، تنظر الغالبية إلى الخلايا الجذعية الجنينية embryonic stem cells (ES)، وهي مشتقات المستنبتات الخلوية لكتلة الخلايا الداخلية للكيس الأصل (الأرومي) blastocyst [15]، على أنها خلايا بدائية. وبالرغم من إثبات المقدرة الكامنة المتعددة لهذه الخلايا الجذعية الجنينية ES المستنبتة، ومن كون هذه الخاصية هي الأساس في تطوير فئران محوّرة وراثياً أو فئران تحتوي على طفرات مميتة، إلا أنه لا يوجد أي دليل حتى الآن على مقدرة خلايا الكيس الأصل الأولية على التجدد الذاتي في الحي in vivo. أكثر من ذلك، من الواضح أنّ خلايا الكيس الأصل الجنينية لا تعمل طوال حياة المتعضية. في الحقيقة، من الممكن القول إن خلايا السلالة المنشئة تؤدي وظيفة التجدد الذاتي كليّ المقدرة totipotent self-renewal للمتعضية. هل تشكل خلايا السلالة المنشئة الخلَف التشكلي الحقيقي لخلايا الكيس الأصل الأولية؟ في معظم الحيوانات تشكل الخلايا الجنسية الأولية الجنينية الخلايا الجذعية للسلالة المنشئة (المنتجة للأعراس الذكرية والأنثوية). تظهر هذه الخلايا الجذعية للسلالة المنشئة للمرة الأولى مع بداية التكوّن المنسلي غير الناضج [16]. تتميز الثدييّات عن معظم الحيوانات الأخرى في كون الخلايا الجذعية المنسلية النطفية هي فقط التي تستمر طيلة فترة حياة المتعضية، بينما يتشكل عدد محدود فقط من الخلايا البيضية بعد فترة قصيرة من الولادة. لا تعتبر الخلايا المنشئة الأولية الجنينية خلايا جذعية، وذلك لأنها لا تتجدد ذاتياً كما أنها لا توجد طيلة فترة حياة المتعضية. ومن المفاجئ أنه بالرغم من أن حقن الخلايا الأولية المنشئة داخل أكياس أصلية لا يؤدي إلى مساهمة هذه الخلايا في السلالة المنشئة أو في الخلايا الجسمية، فإن خلايا السلالة المنشئة الجنينية الناتجة عن خلايا السلالة المنشئة المستنبتة في وسط مغذٍّ تسلك سلوكاً مشابهاً بشكل ملحوظ لسلوك الخلايا الجذعية الجنينية ES من حيث مقدرتها الكبيرة على تشكيل الأنسجة داخل الخيميرات [17]. سيتم التطرق إلى أهمية هذا التحول/العودة عن التمايز المحرض بالاستنبات في الزجاج في قسم لاحق من هذا المقال من حيث دور دراسات استنبات الخلايا في فهم مطاوعة plasticity الخلايا الجذعية وتشكل السلالات الخلوية.

إذا كانت الخلايا الجذعية النهائية للسلالة المنشئة تظهر في وقت متأخر نسبياً من عملية التطور الجنيني، فما الذي نعرفه عن الظهور التشكلي للخلايا الجذعية في الأنسجة الجسمية؟ لربما كانت الخلايا الجذعية المشكلة للدم التي تنشأ عنها كل خلايا الدم والخلايا المناعية هي أفضل ما دُرس من الخلايا الجذعية. إن المنشأ الدقيق للخلايا الجذعية المشكلة لخلايا الدم هو محل خلاف إلى حدٍّ ما [18]. ففي الفئران، يُصادَف منشأ الخلايا الجذعية المشكّلة للدم في الجُزُر الدموية الموجودة في كيس المح (الوريقة الوسطى الخارج جنينية) في اليوم السابع لتطور الجنين (E7). وتظهر جماعة منفصلة من طلائع الخلايا المشكلة للدم الداخل جنينية في منطقة الطبقة الحشوية جانب الأبهرية paraaortic splanchnopleura / منطقة الكلية الوسطى-العرف التناسلي (البولي)- الأبهر aorta-gonad-mesonephros بين اليومين الثامن (E8) والعاشر (E10) من تطوّر الجنين. وتبقى العلاقة بين الجماعتين الخلويتين غير محددة، لكن من المتفق عليه أن الموقع النهائي لتشكل خلايا الدم hematopoiesis ينتقل إلى الكبد الجنيني حوالي اليوم العاشر (E10) أو اليوم الحادي عشر (E11) لتطور الجنين و ينتقل في النهاية إلى الطحال spleen ونقي العظم bone marrow بعد اليوم الخامس عشر (E15) من تطور الجنين.

مع أن طلائع الخلايا المشكلة لخلايا الدم في منطقة الكلية الوسطى-العرف التناسلي (البولي)-الأبهر وفي منطقة الكبد الجنينيتين تبدي مقدرة إعادة استيطان متشابهة عند حقنها في مضيفين تعرضوا لجرعات مميتة من

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

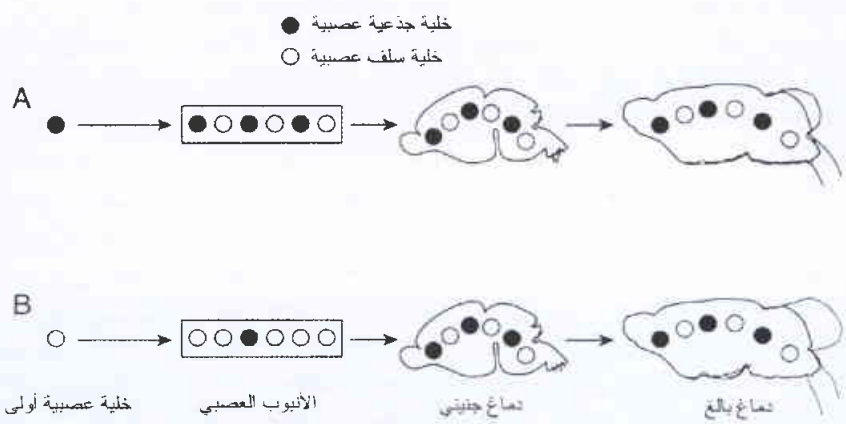
الإشعاع، إلا أنّه يُعتقد أن النمط الشكلي للخلايا الناتجة وشكل (نموذج) التعبير المورثي للخلايا الجذعية المشكلة للدم المشتقة من نقي العظم واضح ومميز [19]. ويعتقد أن الاختلافات، وبشكل خاص تلك المتعلقة بسلالة تشكل كريات الدم الحمراء erythroid lineages التي تبدي ميلاً باتجاه خلايا أصغر حجماً وتعبير مورثي عن الغلوبين globin المميز للبالغين، تعكس متطلبات الاستتباب الفريد homeostatic للمرحلة التي تلي الولادة وحتى البلوغ. وعلى الرغم من أن هذا لا يخالف الرأي السائد بأن الخلايا الجذعية المنشئة لخلايا الدم عند البالغين نشأت من نظيرات لها ذات منشأ جنيني مبكر، فإن السؤال المثير للفضول هو فيما إذا كانت الخلايا الجذعية المشكلة للدم عند البالغين مبرمجة لتعمل بشكل مختلف وفيما إذا كانت هذه البرمجة غير عكوسة.

يبدو أن هناك ازدياداً واضحاً في عدد الخلايا الجذعية المولدة لخلايا الدم القادرة على إعادة استيطان مضيف عُرّض لجرعات قاتلة من الإشعاع؛ كلما تقدمنا من الأبهر- العرف التناسلي - الكلية الوسطى إلى الكبد الجنيني ووصولاً إلى نقي العظم عند البالغين [18]. وبالمثل، يلاحظ ازدياد كبير في عدد الخلايا الجذعية العصبية في الدماغ الأمامي خلال المرحلة المتقدمة من التكون الجنيني عند الفئران [7]. لذلك، تشير الأدلة المتوفرة إلى ظهور متزايد لكل من الخلايا الجذعية للسلالة المنشئة والخلايا الجذعية المولدة للأنسجة الجسمية ابتداءً من مرحلة ما حول الولادة وصولاً إلى مرحلة البلوغ من دورة الحياة عند الثدييات، كجزء من مقدرة المتعضية على إعادة الاستيطان والتجدد (الشكل 1). وهذا يقود إلى الاستنتاج المناقض للبديهة (والمثير للجدل) بأن الخلايا الجذعية قد لا تكون أولى الخلايا الجنينية في نسيج معين، لِتقوم بتخليق هذا النسيج، ولكنها تظهر في مرحلة متأخرة من التشكل حيث يصبح ممكناً لها إعادة تجديد الأنسجة عند الأفراد البالغين.

المسبب

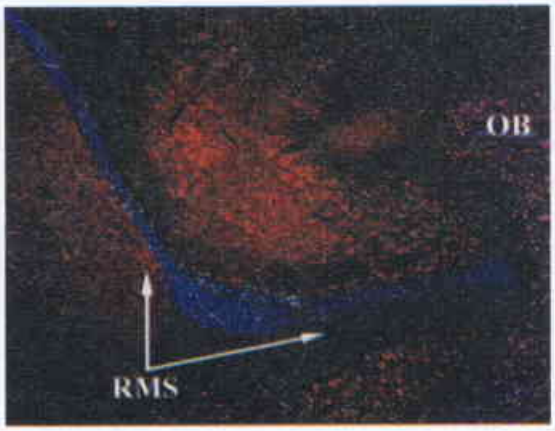
يوحي الانتقال (التغير)، من وجود عدد كبير من الخلايا السلف الأكثر محدودية في قدرتها على تشكيل الأنسجة إلى ظهور متأخر لجماعة من الخلايا الجذعية ذاتية التجدد طيلة حياة المتعضية وتمتلك مقدرة كامنة متعددة وتشارك في إعادة تجديد الأنسجة، بأنه يمكن أن تكون الخلايا الجذعية المتمايزة من أجل القيام بمهمة محددة، خلال مرحلة البلوغ من حياة الفرد، ضرورية من أجل بقاء المتعضية. ومؤخراً، تمّ الحصول على دعم لا يقبل الجدل لهذه الظاهرة وذلك من خلال أبحاث أُجريت على الدماغ الأمامي عند الثدييات. تلا اكتشاف الخلايا الجذعية العصبية للدماغ الأمامي للأفراد البالغين [20] في البقايا الجنينية للنطاق المنشئ المحيط بالبطين الجانبي، توفرُ دليلٍ حول اشتراك هذه الخلايا في إعادة استيطان ما تحت سيساء البطين الجانبي بعد تعرضه للإشعاع [21]. تلا ذلك، تبيان أن منطقة ما تحت السيساء هي مصدر نشوء العصبونات الحديثة ، والتي تهاجر على طول مسار الخلايا الدبقية لتصل إلى البصلة الشمية olfactory bulb عند القوارض (الشكل 2)، [22] وعلى طول مسار يُزعم بأنه غير معروف وصولاً إلى الجزء المتعلق بالربط الذهني من القشرة المخية لدى الرئيسات غير البشرية [23]. وإذا ما ثبت اشتراك عصبونات حديثة بالغة في إعادة استيطان قطاعات ذات علاقة بالشم عند القوارض، وأخرى تتعلق بالتذكر عند القرود، فإن هذا سيدعم الرأي القائل باشتراك الخلايا الجذعية في عملية تجدد الأنسجة، ربما في سبيل المحافظة على بقاء المتعضية. من جهة أخرى، أظهرت دراسة حديثة أنه يمكن لخلايا جذعية عصبية من منطقة الدماغ الأمامي أن تساهم، إثر حقنها في الدورة الدموية لمضيفين جرى تعريضهم للتشعيع، في إعادة تشكيل سلالة الخلايا المشكلة للدم [24]. هل تخالف هذه النتائج فكرة التخصص، وخاصة بالنسبة للخلايا الجذعية العصبية البالغة؟

تشير سلسلة من التقارير الحديثة المثيرة للفضول حول خلايا نقي العظم الجذعية إلى أن هذه الخلايا تمتلك مقدرة كامنة غير محدودة نسبياً. وفي الوقت نفسه، قد تساعد هذه الدراسات في إلقاء الضوء على بعض التقارير الحديثة التي تشير إلى لدونة (مطاوعية) مدهشة تبديها الخلايا الجذعية العصبية البالغة. تضم خلايا نقي العظم الجذعية عند البالغين خلايا جذعية مكوِّنة للدم وخلايا جذعية سدوية stromal stem cells وينشأ عن هذه الأخيرة سلالات خلوية متوسطية mesenchymal كتلك الخاصة بالعظام والغضاريف. لدى حقن خليط من خلايا نقي العظم الجذعية داخل الدورة الدموية لفئران بالغة مشعّعة يلاحَظ مساهمتها في نشوء خلايا دبقية دقيقة microglia وخلايا دبقية نجمية astroglia في مناطق مختلفة من الدماغ [25]، وخلايا العضلات الهيكلية الجديدة في عظم الظنبوب الأمامي tibialis anteriors الذي كان قد حُفِّزَ فيه فقدان النسيج العضلي [26]، وخلايا كبدية بيضاوية جديدة (طلائع لخلايا الكبد المتمايزة [27]). أظهرت دراسات أكثر حداثةً، معتمدة على تقنية التنقية التفريقية أن الخلايا الجذعية السدوية



الشكل 1– نموذجان محتملان للنشوء التشكلي للخلايا الجذعية (العصبية). وبالرغم من أن النموذجين يمثلان الأنسجة العصبية، ولكنهما قد ينطبقان على جميع الأنسجة التي لديها خلايا جذعية. **(A)** الخلية الجذعية العصبية (التي تتمتع بالقدرة على التجدد الذاتي لأطول فترة من بين الخلايا الجذعية) هي الخلية الأولى التي تظهر في الجملة العصبية المتشكلة، وهي تشكل جميع الخلايا السلف، العصبية (أقل قدرة على التجدد الذاتي) والدُرّية التي تنتج عنها؛ العصبونات المتمايزة، الخلايا النجمية، الخلايا قليلة التغصنات. **(B)** خلية عصبية سلف (أقل قدرة على التجدد الذاتي) هي الخلية الأولى التي تنشأ في الجملة العصبية المتشكلة، حيث تنشأ الخلايا الجذعية العصبية في مرحلة متأخرة من التشكل لتكوّن غداً أكبر من الخلايا العصبية ولتعيد تشكيل التراكيب العصبية البالغة

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 2– تكوّن الدماغ الأمامي البالغ. مقطع سهمي للدماغ الأمامي عند الفئران [تمّ وسم العصبونات البالغة من أجل NeuN (مستضد عصبي)، اللون الأحمر] يُظهر طلائع عصبونية موسومة بالـ برومو دي أوكسي يوريدين bromodeoxyuridine (اللون الأخضر) مهاجرة على طول مسار الهجرة الرأسي (RMS) (صبغة أزرق هويشت blue Hoechst stain) باتجاه مقرها النهائي في البصلة الشمية (OB).

المحقونة مباشرة داخل البطينين الدماغيين الجانبيين لحديثي الولادة بإمكانها إعطاء خلايا دبقية نجمية متمايزة [28]، في حين ساهمت الخلايا الجذعية المشكلة للدم في إعطاء خلايا ألياف عضلية جديدة، ويمكن كذلك لخلايا العضلات الجذعية لدى أفراد ما بعد الولادة أن تصنع الدم [3، 29].

كيف تؤثر مساهمة الخلايا الجذعية البالغة المشكّلة للدم في تشكيل خلية دماغية جديدة، أو خلية عضلية جديدة، أو خلية كبدية عند الأفراد البالغين في تعديل فهمنا لتحديد مصيرها السلالي؟ قد يكون الوسط المحيط الدقيق للأفراد البالغين، وبالأخص الإجهاد الناجم عن التشعيع أو تدرُّك النسيج العضلي، ذا أهمية استثنائية حاسمة في إفساح المجال أمام لدونة النمط الشكلي التي تبديها الخلايا الجذعية المشكلة للدم. على عكس ذلك، عندما ازدُرِعت خلايا جذعية مشكّلة للدم داخل أكياس أصلية جنينية بقيت مشاركة هذه الخلايا في تشكيل الخميرة الناشئة مطابقة وأمينة للنمط الشكلي لهذه الخلايا، وبدون وجود أي دليل على مساهمة الخلايا المانحة في تشكيل أنسجة جسمية بالغة أخرى [30]. تؤكد هذه المشاهدات المختلفة جداً لإمكانات التمظهر التي تبديها الخلايا الجذعية البالغة المشكّلة للدم الحاجة إلى أخذ الوسط المحيط الدقيق في الحي بعين الاعتبار، وإلى ضرورة التمييز بين الحالات الفيزيولوجية (الوظيفية) الطبيعية وبين الحالات التي يثيرها حدوث أذية للمتعضية، قبل الوصول إلى استنتاجات تتعلق بالتحديد السلالي البالغ. و بالفعل، فإن التعديلات التي قد تطرأ على الوسط المحيط الدقيق بتحفيز من أذية ما تتعرض لها المتعضية قد تكون ضروريةً لتحريض بعض التغيرات النمطية الشكلية الأكثر وضوحاً في الخلايا.

في الحقيقة، قد يكون مثل هذا الحذر في الوصول إلى الاستنتاجات مهماً خاصة عندما يتعلق الموضوع بالتخصص السلالي للخلايا الجذعية العصبية البالغة والخلايا السلَف. إن مقدرة خلايا نقي العظم الجذعية على المشاركة في تشكيل خلايا دبقية نجمية، وكون الخلايا الشبيهة بالدبقية النجمية البالغة في ما تحت السحاء هي أساساً خلايا جذعية عصبية، وكون الخلايا الجذعية العصبية البالغة قادرة على إعطاء سلالات مشكّلة للدم، هذه جميعاً تثير احتمالاتٍ مدهشةً حول العلاقة طويلة الأمد بين خلايا الدم والدماغ عند الثدييّات البالغة. يمكن أن يكون لهذا أهمية فيما يتعلق بأصل الخلايا الدماغية الفتية neoplasm*، بالرغم من عدم توفر أية معلومات موثقة حول هذه النقطة. ومع ذلك، يبقى موضوع فيما إذا كانت الخلايا الجذعية العصبية البالغة تساهم في الموضع in situ في تشكيل أنسجةٍ غير تلك التي حُدِّدت لها، أساساً غير مؤكد. ففي حين يبدو أن خلايا نقي العظم الجذعية (معزولة بدون استنبات أو باستنبات لفترة قصيرة في الزجاج، كما لا تتطلب أبداً تشعيع المضيف) تساهم بشكل مباشر في تشكيل أنسجة أخرى فإن استنباتاً طويل الأجل وتمدداً استطالياً للخلايا الجذعية العصبية البالغة والخلايا السلف قد يكونا ضروريين ليحصل انحراف في تحديدها السلالي [24، 31]. قد يسمح تكاثر خلايا جذعية مخصصة مسبقاً أو خلايا سلف لفترات طويلة في مستنبتات خلوية في العودة عن تمايزها (فقدان هويتها) وإعادة تخصيصها. وقد تمَّ التأكيد على هذه الفوارق سابقاً من قبل سلاك Slack الذي أشار إلى الفرق بين مواصفات النمط الشكلي الخلوي (في بيئة طبيعية أو محايدة) وفيما إذا كان هذا النمط الشكلي الخلوي أيضاً محدداً مسبقاً، بمعنى أن هذه الخلايا محدُدة بشكل غير عكوس لهذا النمط الشكلي في أوساط مختلفة ومتعددة [32].

الاستنتاجات

ترتبط تساؤلات "لماذا" الخلايا الجذعية ارتباطاً وثيقاً بمواضيع تتعلق بتشكل السلالات الخلوية. وفي ضوء التقارير الحديثة التي تقترح أنّ الخلايا الجذعية من نمط نسيجي ما لديها المقدرة على إعطاء خلايا نسيج مختلف عن النسيج الذي نشأت منه (من نباتات إلى ثدييّات)، يُطرح التساؤل حول جدوى دراسات السلالات الخلوية بعد اليوم. إذا أمكن لنا التعرُّف على عوامل الاستنساخ الوراثي التي تمتلك القدرة على تحويل خلية متمايزة إلى خلية متمايزة أخرى مختلفة، فهل نفقد القدرة التنبؤية التي تمدنا بها دراسات تشكل السلالات الخلوية (ابتداءً من الخلايا الجذعية وصولاً إلى خلايا نسيجية متمايزة)؟ ويصبح تعريف التمايز بالضرورة على أنه أي تغير يطرأ على خلية، بحيث لم يعد يوجد مفهوم واضح للسلالة الخلوية، ولا وجود لما يُسمى بالتمايز التقدمي. وبالرغم من أنّ هذا قد يكون صحيحاً في بعض الحالات، فإنّ الدليل المتوفر لم يعد مقنعاً. إن تصوراً كهذا سيجعل التعاريف المتداولة على مستوى الخلية عديمة النفع: وسينحسر تعريف التمايز ليقتصر على قائمة من التشكيلات الوراثية التي تشترك في التعبير عن نفسها في وقت واحد. من المهم الإشارة إلى أنّ مفهوماً مشابهاً في محدوديته ظهر لتفسير تطوّر المتعضية نتيجةً للتطبيق أحادي النظرة لمبادىء البيولوجيا الجزيئية [33]. وما هو مفقود في كلتا الحالتين هو إعطاء درجة من الأهمية للتشكل السلالي؛ أي أن الخلايا في الحي لديها تأريخٌ سلالي، وأنّ تمايزها المستقبلي غالباً ما يعتمد على هذه التواريخ. إنّ مقارنة مصير الخلايا الجذعية السُلالي في الحي والتغيرات التي تطرأ على هذا المصير بعد التعرض لأوساط جديدة يفسر "لماذا" تعتبر الخلايا الجذعية مثيرة إلى هذه الدرجة.

* نيوبلازم neoplasm: مجتمع محدود من خلايا نشطة ولا تحكمها العوامل المحدودة التي تحافظ على النمو الطبيعي للخلايا.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

REFERENCES المراجع

[1] N. Tinbergen, Z. Tierpsychol. 20, 410 (1963).

[2] M. A. Goodell et al., J. Exp. Med. 183, 1797 (1996).

[3] E. Gussoni et al., Nature 401, 390 (1999).

[4] A. J. Zhu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 6728 (1999).

[5] S. Weiss et al., Trends Neurosci. 19, 387 (1996).

[6] F. M. Watt and B. L. M. Hogan, Science 287, 1427 (2000).

[7] D. J. Martens, V. Tropepe, D. Van der Kooy, J. Neurosci. 20, 1085 (2000).

[8] A. P. Korn et al ., Exp. Hematol. 1, 362 (1973).

[9] H. R. Bode, J. Cell Sci. 109, 1155 (1996).

[10] F. Doetsch et al., Cell 97, 703 (1999).

[11] D. N. Cox et al., Genes Dev. 12, 3715 (1998).

[12] P. N. Benfey, Curr. Biol. 9, R 171 (1999).

[13] F. C. S. Steward, M. O. Mapes, K. Mears, Am. J. Bot. 45, 705 (1958); V. Vasil and A. C. Hildebrand, Science 150, 889 (1965); V.L. Dodeman, C. Ducreux, M. Kreis, J. Exp. Bot. 48, 1493 (1998).

[14] K. J. Peterson, R. A. Cameron, E. H. Davidson, Bioessays 19, 623 (1997).

[15] M. Evans and M. Kaufman, Nature 292, 154 (1981); G. Martin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 78, 7634 (1981).

[16] H. Lin, Annu. Rev, Genet. 31, 455 (1997).

[17] Y. Matsui, K. Zsebo, B. L. M. Hogan, Cell 70, 841 (1992); J. L. Resnick, L. S. Bixler, L. Cheng, P. J. Donovan, Nature 359, 550 (1992); C. L. Stewart, I. Gadi, H. bhatt, Dev. Biol. 161, 626 (1994).

[18] E. Dzierzak, A. Medvinsky, M. de Bruijn, Immunol. Today 19, 236 (1998).

[19] C. Bonifer, N. Faust, H. Geiger, A. M. Muller, Immunol. Today 19, 236 (1998).

[20] B. A. Reynolds and S. Weiss, Science 255, 1707 (1992).

[21] C. M. Morshead et al., Neuron 13, 1071 (1994).

[22] C. Lois and A. Alvarez-Buylla, Science 264, 1145 (1994); C. Lois, J. M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Science 271, 978 (1996).

[23] E. Gould, A. J. Reeves, M. S. A. Graziano, C. G. Gross, Science 286, 548 (1999).

[24] C. R. R. Bjornson, R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, A. L. Vescovi, Science 283, 534 (1999).

[25] M. A. Eglitis and E. Mezey, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 4080 (1997).

[26] G. Ferrari et al., Science 279, 1528 (1998).

[27] B. E. Petersen et al., Science 284, 1168 (1999).

[28] G. C. Kopen, D. J. Prockop, D. G. Phinney, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 10711 (1999).

[29] K. A. Jackson, T. Mi, M. A. Goodell, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 14482 (1999).

[30] H. Geiger, S. Sick, C. Bonifer, A. M. Muller, Cell 93, 1055 (1998).

[31] J. O. Suhonen, D. A. Peterson, J. Ray, F. H. Gage, Nature 383, 624 (1996); M. Takahashi; T. D. Palmer, J. Takahashi, F. H. Gage, Mol. Cell. Neurosci. 12, 340 (1998).

[32] J. M. W. Slack, From Egg to Embryo (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983).

[33] G. S. Stent, Cell 40, 1 (1985)■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

الدَّور الحاسم للعش في تقرير مصير الخلايا الجذعية الميلانينية*

إمي. ك. نيشيمورا وآخرون
قسم الوراثة الجزيئية - جامعة كيوتو - اليابان

ملخص

يُعتقَد بأنه يتمُّ الحفاظ على الخلايا الجذعية (التي تمتلك القدرة على التجدُّد الذاتي وتوليد ذُريّة متمايزة) في بيئة ملائمة خاصة تُعرف بالعش niche [1–3]. غير أن موقع هذا العش لأغلب أنظمة الخلايا الجذعية لايزال غامضاً. وفي جُريبات الشعر hair follicles تنمو الخلايا الميلانينية melanocytes (خلايا صباغية) وتتمايز بشكلٍ وثيق الارتباط مع دورة تجدُّد الشعرة [4]. وباستخدام فئران محوّرة وراثياً [5,6] من النمط Dct-lacZ، نبيّن في هذا المقال أنه يمكن الكشف عن الخلايا الجذعية الأرومية للخلايا الميلانينية في الجزء السفلي الدائم من جُريبات شعر الفأر عبر كامل دورة الشعرة. مجموعة الخلايا الموجودة في هذه المنطقة هي فقط التي تحقّق المميّزات التي يجب أن تتوافر في الخلايا الجذعية، كونها غير ناضجة وبطيئة الدورة الخلوية، وتحافظ على نفسها بنفسها، وقادرة تماماً على توليد الذُّريّة لدى تنشيطها في المرحلة الباكرة من طور البناء (anagen = مرحلة نموّ جُريب الشعرة). إن تحريض عملية إعادة الاصطباغ عند الفئران المحوّرة وراثياً [7] من النمط K14-steel factor يبرهن على أن جزءاً من ذُريّة الخلايا الجذعية المتكاثرة يمكنه أن يهاجر خارجاً من العش مع احتفاظه بقدرةٍ كافية على التجدُّد الذاتي كي يقوم بوظيفة الخلايا الجذعية بعد استيطانه أعشاشاً شاغرة. وتشير نتائجنا إلى وجود دور مهيمن للعش في تحديد مصير ذُريّة الخلايا الجذعية الخاصة بالخلايا الميلانينية.

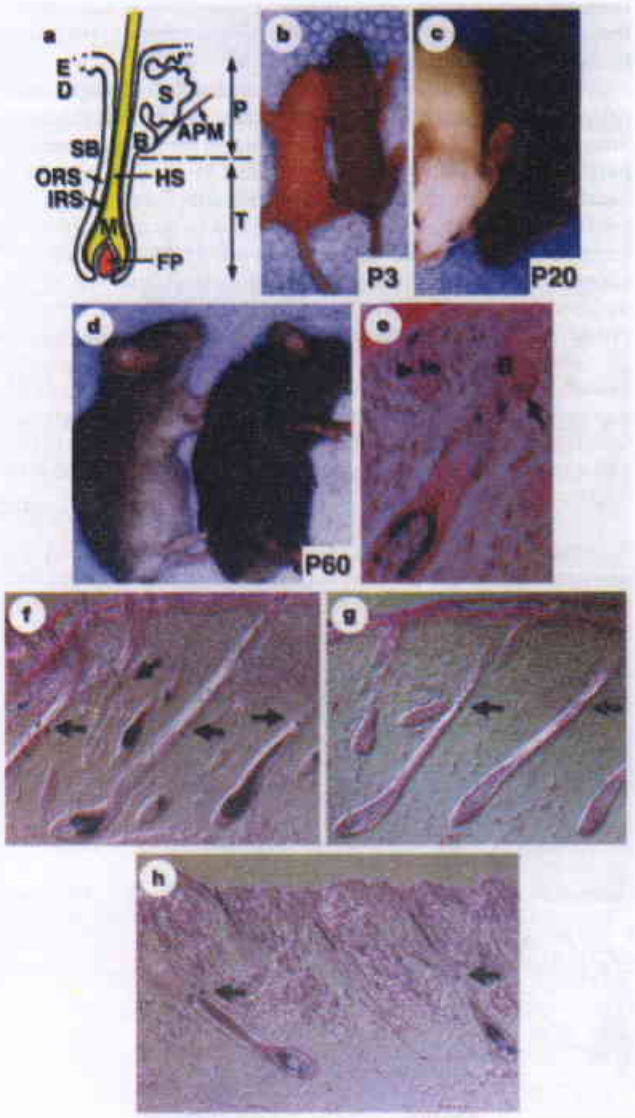
الكلمات المفتاحية: العش، الخلايا الجذعية، الخلايا الميلانينية، جريبات الشعر، اصطباغ الشعر.

يبدأ تجدُّد الشعرة في المرحلة المبكّرة من طور البناء انطلاقاً من منطقة الانتفاخ bulge التي تحتوي على الخلايا الجذعية للخلايا القيراتينية keratinocytes [8–10] (الشكل 1a). ويتبع ذلك نموٌّ باتجاه العمق للجزء القاعدي من جُريب الشعرة المسمّى بالقالَب matrix. بعد ذلك تنكفئ هذه الجريبات في طور الهدم catagen وتصبح خاملة في طور النهاية telogen [11]. وتنمو الخلايا الميلانينية (القتامينية) في قالب الشعرة أثناء طور البناء وتتمايز لتنتج صباغ الميلانين melanin الذي يتمُّ نقله إلى الشعرة، ثم تموت هذه الخلايا موتاً خلوياً مبرمجاً apoptosis أثناء طور الهدم [12]. ويُقسَّم نظام الخلايا الجذعية إلى ثلاث مقصورات compartments وهي : الخلايا الجذعية، الخلايا المتكاثرة بشكل مؤقّت، والخلايا الناضجة [13]. وتوجد هاتان المقصورتان الأخيرتان لسلالة الخلايا الميلانينية في قالَب الشعرة. أما بالنسبة لمقصورة الخلايا الجذعية للخلايا الميلانينية، وعلى الرغم من اقتراح نماذج مختلفة لها [14–18]، فلا توجد إلى الآن أية دراسة نجحت في تمييز جماعة من الخلايا الأرومية الميلانينية المحقّقة لمميزات الخلايا الجذعية [13].

لقد استخدمنا وسيلتين اثنتين من أجل تحديد موقع الخلايا الجذعية الميلانينية. الوسيلة الأولى هي فئران محوّرة وراثياً تحمل المورّثة المخبِرة lacZ الموضوعة تحت سيطرة محضّضة المورثة Dct(Dct-promotor) وتُرمّز المورثة Dct الأنزيم "دوباكروم تاوتوميراز" dopachrome tautomerase المعروف أيضاً باسم TRP-2، وهو واسمة باكرة لسلالة الخلايا الميلانينية. وجدنا أن التعبير عن المورثة الهجينة Dct-lacZ لدى الفئران المحوّرة وراثياً يتطابق مكانياً مع التعبير عن RNA الرسول (mRNA) الخاص بمورّثة Dct (نتائج غير معروضة)، وهذا يتيح لنا الكشف عن الخلايا Dct^+ بحساسيّة فائقة. ثانياً، استخدمنا ضداً معاكساً وحيد النسيلة وهو ACK2، من أجل تعطيل وظيفة البروتين Kit (وهو واسمة أخرى لسلالة الخلايا الميلانينية) [19]. وكنّا قد بيّنا سابقاً أن معالجة الفئران بالضد ACK2 تؤدي بشكل انتقائي إلى انحسار الجماعات المتكاثرة من الخلايا الأرومية الميلانينية و الخلايا المنوية والخلايا الأرومية الدموية [19–22]، تاركةً الخلايا الهاجعة سليمةً. وتقوم الخلايا الأرومية الميلانينية في فترة ما حول الولادة باستيطان جريبات الشعر المتشكّلة بعد أن تهاجر عبر الأدمة والبشرة [24,23]. وفي هذه الدراسة، وعند علاج الفئران حديثة الولادة بالضد ACK2، كانت تقريباً جميع الشعرات الأولى المتشكّلة خاليةً من الصباغ (الشكلان 1b، c). ولكن، في دورة الشعر التالية، عاد وتثبّت صباغ الشعر في الشعر الظهري [25] (20% من الشعر الظهري) وفي

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Nature*, Vol.416, 25 April 2002. ترجمة الدكتور عمار مدنية - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

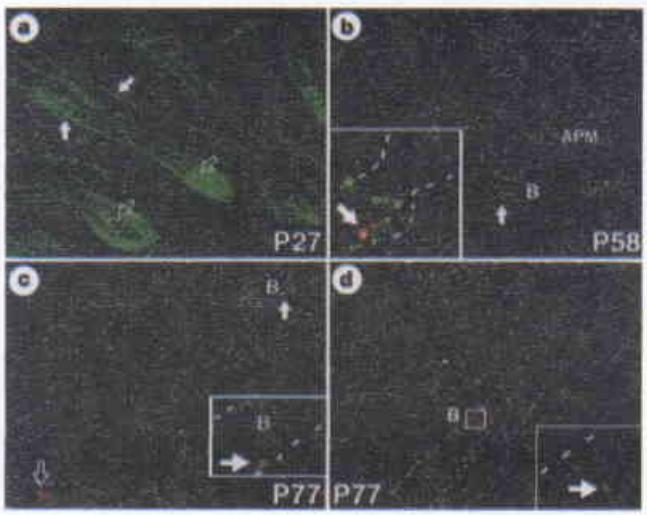
http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



الشعر الحساس البطني (2% من الشعر البطني) (الشكل 1d) الذي يتشكّل أبكر من باقي الشعر (الشكل 1e)، ممّا يشير إلى وجود طلائع غير متعلّقة بِـ Kit في مكانٍ ما من الجريبات. وبالفعل، لاتوجد الخلايا

الشكل 1– تعيش الخلايا $Dct\text{-}lacZ^+$ الموجودة في منطقة الانتفاخ بطريقة مستقلّة عن البروتين Kit. **a**: بنية جريب الشعرة. B، منطقة الانتفاخ. SB، منطقة ما تحت الانتفاخ. ORS، غمد الجذر الخارجي. HS، جذع الشعرة. E، البشرة. D، الأدمة. IRS، غمد الجذر الداخلي. S، الغدّة الدهنية، APM العضلة الناصبة للشعرة. M، قالَب الشعرة. FP، حلمة الجريب. P، الجزء الدائم. T، الجزء الانتقالي. **b-d**: لون فرو الفئران الحديثة الولادة المعالَجة بالضد ACK2 (يسار) وغير المعالَجة (يمين). **e-h**: توضّع الخلايا الأرومية الميلانينية الإيجابية التلوين $lacZ^+$ (الأسهم) في جريبات شعر الفئران الشاهدة في اليوم P0.5 (e) واليوم P3 (f)، وفي جريبات شعر الفئران المعالَجة بالضد ACK2 في اليوم P3 (g) واليوم P25 (h) بعد الولادة. يشير رأس السهم في e إلى خلية أرومية ميلانينية في برعم شعري متأخر التشكّل. لاحظ أن الخلايا الإيجابية التلوين $lacZ^+$ لاتوجد إلّا في منطقة الانتفاخ لجريبات فقط الشعر العلوي المعالَجة بالضد ACK2 (g)، وأن هذه الجريبات فقط هي التي تحتفظ بالخلايا الميلانينية لقالَب الشعرة في دورة الشعر القادمة (h). التكبير الأصلي : $\times 100$ (e); $\times 200$ (f-h)

$Dct\text{-}lacZ^+$ إلا ضمن غمد الجذر الخارجي ORS للقسم الدائم السفلي حصراً، أي في منطقة الانتفاخ حيث ترتبط العضلة الناصبة للشعرة، وأحياناً أيضاً في منطقة ما تحت الانتفاخ، من جريبات شعر الفئران المعالَجة بالضد ACK2 (الشكل 1g). ولدى الحيوانات الشاهدة، نجد أن الخلايا $Dct\text{-}lacZ^+$ هي أيضاً غزيرة في قالَب الشعرة (الشكل 1f). وأثناء طور البناء في دورة الشعر التالية، وجدنا خلايا ميلانينية في قوالب الشعر الظهري والشعر الحساس البطني، والتي تحتفظ منطقة انتفاخها بخلايا $lacZ^+$ (الشكل 1h). علاوة على ذلك، استوطنت خلايا $lacZ^+$ منطقةَ انتفاخ هذه الجريبات المتشكّلة حديثاً بعد نصف يوم من الولادة (الشكل 1e)، وبقيت على قيد الحياة بطريقة غير متعلّقة بِـ Kit مع مستوى تعبير عن Kit منخفض أو غير قابل للكشف. وقد تمثّل هذه الخلايا الأرومية الميلانينية، الموجودة في منطقة الانتفاخ وما تحتها مباشرة، مقصورةَ الخلايا الجذعية لسلالة الخلايا الميلانينية. ومن أجل تحديد هويتها مباشرةً كخلايا جذعية، لابدّ لهذه الخلايا من أن تُظهر صفاتٍ تتمتع بها مقصورة الخلايا الجذعية. لذا قمنا بدراسة معدّل تكاثرها وقدرتها الوظيفية على تجديد سلالة الخلايا الميلانينية في جريبات شعر جديدة.



بغية تقدير معدّل التكاثر، تمّ وسم الخلايا بمادة 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) أثناء منتصف طور البناء الباكر لدى الفئران Dct-lacZ المحوّرة وراثياً. وباستخدام هذه الطريقة نجد أن معظم خلايا البشرة وخلايا الجريبات بما في ذلك الخلايا $lacZ^+$ (الأسهم في الشكل 2a) قد وُسمت بـ BrdU. وقمنا بمتابعة الوسم لمدة 26–70 يوماً (عبر دورة أو دورتين

الشكل 2– الخلايا الأرومية الميلانينية الموجودة في منطقة الانتفاخ تحتفظ بـ BrdU خلال دورة الشعرة. تمّ حقن الفئران المحوّرة وراثياً Dct-lacZ تحت الجلد بمحلول BrdU (10 مكرو/غرام لكل غرام من وزن الجسم) مرتين يومياً من اليوم P20 حتى اليوم P27 (a-c) أو من اليوم P0 حتى اليوم P7 (d) بعد الولادة. اللون الأحمر: أنزيم β-galactosidase؛ اللون الأخضر: BrdU. a: تمّ وسم جميع الخلايا تقريباً بـ BrdU في اليوم P27 بعد الولادة مباشرةً بعد الحقن. **b-d**: في اليوم P58 واليوم P77 بعد الولادة لم يتم الاحتفاظ بـBrdU إلا في الخلايا الموجودة في منطقة الانتفاخ: أي في الخلايا القيراتينية والخلايا الأرومية الميلانينية الإيجابية التلوين $lacZ^+$ (السهم المملوء)، ولكن ليس في الخلايا الميلانينية ضمن قالَب الشعرة (السهم الفارغ). B، منطقة الانتفاخ. APM، العضلة الناصبة للشعرة. التكبير الأصلي: $\times 200$ (المربّعات $\times 500$).

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

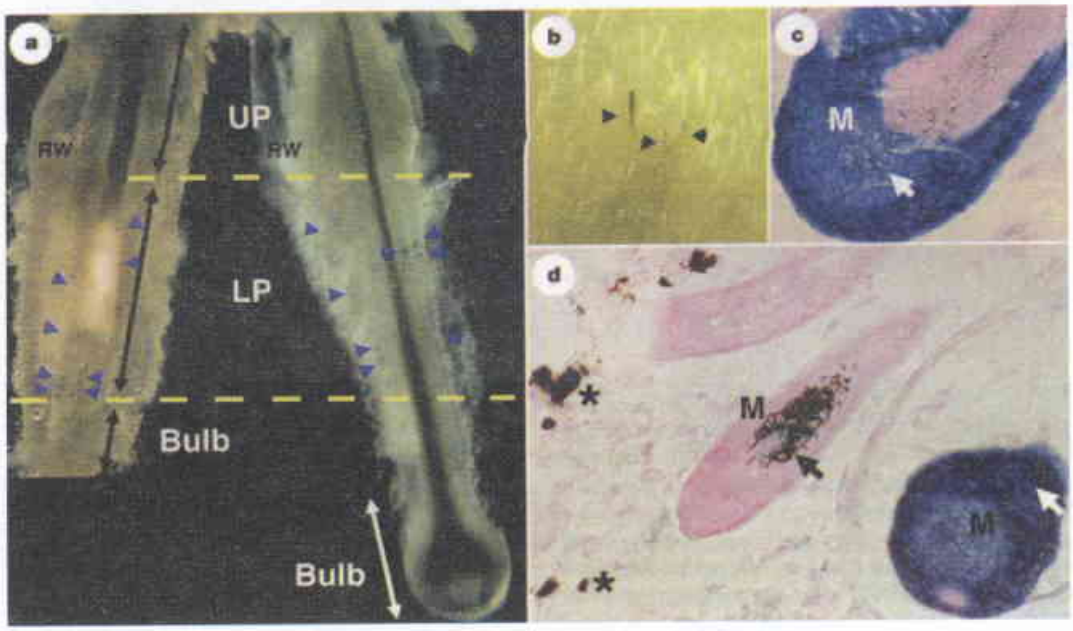
للشعر)، وأتبعنا ذلك بتلوين وميضي مناعي لـ BrdU. وفي اليوم P58 بعد الولادة، فقط الخلايا الموجودة في منطقة الانتفاخ لجريبات الشعر في طور النهاية، بما في ذلك الخلايا الأرومية الميلانينية $lacZ^+$، احتفظت بالمادة الواسمة في نواها (الشكل 2b). وحتى بعد 70 يوماً من متابعة الوسم، بقيت الخلايا الأرومية الميلانينية $lacZ^+$ الموجودة في منطقة الانتفاخ محتفظةً بـ BrdU (الشكل 2d)، في حين أن الخلايا الميلانينية الموجودة في قالَب الشعرة فقدت BrdU (الشكل 2c). علاوة على ذلك، لم يكن ممكناً وسم الخلايا الأرومية الميلانينية $lacZ^+$ الموجودة في منطقة الانتفاخ إلا في بداية طور البناء الباكر. تشير هذه النتائج إلى أن الخلايا الأرومية الميلانينية الموجودة في منطقة الانتفاخ هي خلايا بطيئة التكاثر ولا يتمّ تنشيطها إلا في طور البناء الباكر، وتتّصف بذلك بخاصية من خصائص الخلايا الجذعية.

من أجل تحديد ما إذا كانت الخلايا الأرومية الميلانينية الموجودة في القسم الدائم السفلي قادرة على تجديد الخلايا الميلانينية في جريب الشعرة، استفدنا من تقنية إعادة تشكيل الشعرة باستخدام جريبات شعر الأنف [9]. ولاحظنا وجود الخلايا الأرومية الميلانينية $Dct\text{-}lacZ^-$ بشكلٍ خاص ضمن غمد الجذر الخارجي للقسم الدائم السفلي لجريبات شعر الأنف على امتداد فترة دورة الشعرة (الشكل 3a، ونتائج غير معروضة). وبالمقابل، لاحظنا وجود الخلايا الميلانينية الناضجة ضمن قالَب الشعرة في طور البناء. كما قسمنا الجريبات إلى ثلاثة أجزاء كما هو مبيَّن في الشكل 3a، وأخذنا أجزاء مستقلة من جريبات فئران ROSA 26 التي تعبّر عن المورّثة المُخبِرة lacZ في معظم أنسجتها بما في ذلك النسيج الظهاري الجريبي [9]، وزرعنا هذه الأجزاء في جلد فئران برصاء albino حديثة الولادة. وحصلنا على تجديد للجريبات الهجينة الشيميرية $lacZ^+$ عند زرع أي من الأجزاء الثلاثة الكائنة في طور الهدم المتأخر، أو عند زرع الجزء الدائم العلوي من الجريب الكائن في أي طور من دورة الشعرة (الجدول I) [9]. ولكن الزروع المأخوذة من الجزء السفلي الدائم هي فقط التي تعطي شعراً مصطبغاً (الشكل 3b-d). وبالمقابل، لم ينجح لا الجزء العلوي الدائم ولا بَصلة الشعرة في أي طور في تشكيل شعر مصطبغ (العدد N = 25 و 17 على الترتيب). تُظهر هذه النتائج أن الخلايا الجذعية الميلانينية تتوضّع فقط في الجزء السفلي الدائم من جريبات شعر الأنف.

بعد ذلك قمنا بدراسة سلوك سلالة الخلايا الميلانينية في الشعر الجسمي الخاضع لدورات نموّ متزامنة. لدى الفئران المحوّرة وراثياً Dct-lacZ، يتمّ الاحتفاظ على الأقل بخلية واحدة $lacZ^+$ في الجزء السفلي الدائم عبر دورة الشعرة (الشكل 4a-i). وهنا تتألف الجماعة الخلوية عادةً من خلايا صغيرة بيضوية الشكل لاتحتوي لاعلى حبيبات الميلانين ولا على أنزيم التيروزيناز، مما يشير إلى أن الخلايا الأرومية الميلانينية الموجودة في

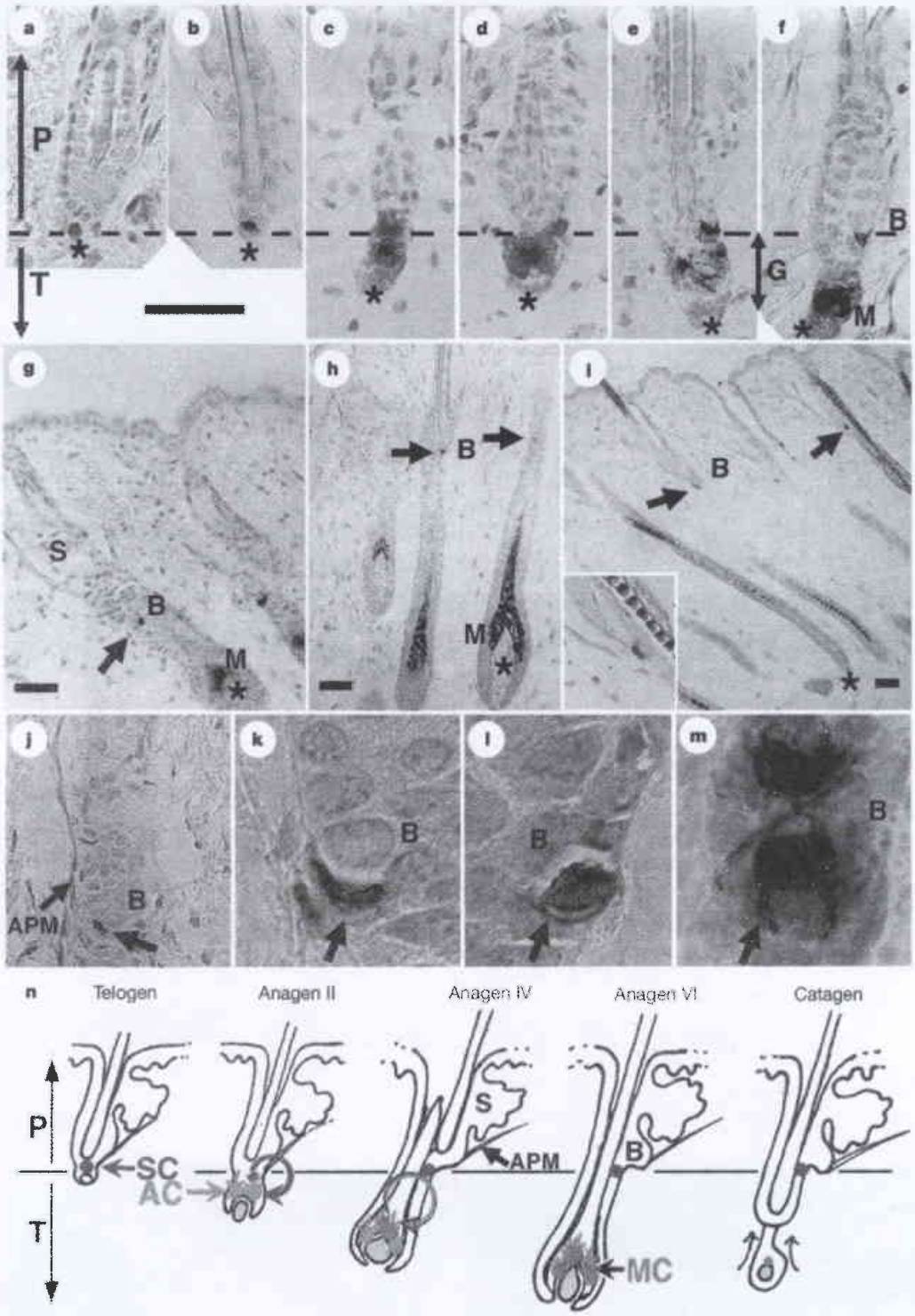
الجدول 1- تشكّل الشعر المصطبغ انطلاقاً من جريبات الشعر الأنفي المزروعة المأخوذة في طور الهدم المتأخر.

منشأ الجزء المزروع	تجدد الشعر	تشكل الشعر المصطبغ
الجزء الدائم العلوي	8/6	6/0
الجزء الدائم السفلي	8/5	5/3
بصلة الشعرة	6/3	3/0



الشكل 3- تجدُّد الخلايا الميلانينية المعقدة انطلاقاً من جزء الدائم السفلي المزروع. a : توزّع الخلايا الإيجابية التلوين lacZ في جريبات الشعر الأنفي لدى الفئران المحوّرة وراثياً Dct-lacZ. إلى اليسار : طور الهدم المتأخر (المرحلة 5)؛ إلى اليمين : طور البناء. تتوضّع الخلايا $^+$melanin - lacZ (الإيجابية التلوين $lacZ^+$ والسلبية الاصطباغ بالميلانين) حصراً في الجزء الدائم السفلي(LP) (رؤوس الأسهم الزرقاء). UP، الجزء الدائم العلوي؛ RW، الانتباج الحلقي. **b-d**: شعر هجين شيميري مجدَّد مصطبغ : تمّ زرع الجزء الدائم السفلي لجريب شعر أنفي مأخوذ من فأر ROSA26 في جلد فأر أبرص (Albino) OF1 مرفقاً بالفحم. **c-d**: يُظهر التلوين الناتج من أنزيم β-galactosidase للجلد في اليوم P35 بعد الولادة أن الجزء الدائم السفلي يشكّل جريبات هجينة شيميرية إيجابية التلوين $lacZ^+$ (الأسهم). M= قالَب الشعرة. تشير النجمات إلى قِطع الفحم. التكبير الأصلي : (c) × 630 ,(d) × 200.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 4- توزّع الخلايا الأرومية الميلانينية (الأسهم) خلال دورة الشعرة. **a**: طور النهاية؛ **b**: طور البناء I؛ **c**: طور البناء II؛ **d**: طور البناء المتأخر II؛ **e**: طور البناء III؛ **f**: طور البناء المتأخر III؛ **g**: طور البناء IV؛ **h**: طور البناء V-VI؛ **i**: طور الهدم. يشير الخط المتقطّع إلى منطقة الانتفاخ، وتشير النجمات إلى حلمة الحريب. **P**= الجزء الدائم، **T**= الجزء المؤقّت، **G**= بذرة الشعرة، **B**= منطقة الانتفاخ، **M**= قالَب الشعرة. شريط المقياس= 50 مِكرومتر. **m-j** : نلاحظ أن الخلايا الأرومية الميلانينية الهاجعة في منطقة الانتفاخ لجريبات طور البناء **VI-V (l-j)** تكون مستديرةً مقارنةً بالخلايا الأرومية الميلانينية المنشّطة في منطقة الانتفاخ في طور البناء **II (m)**. **S**= الغدة الدهنية، **APM**= العضلة الناصبة للشعرة. **n**: ملخّص لسلوك الخلايا الميلانينية خلال دورة الشعرة. يتمّ تنشيط الخلايا الجذعية (المحتفظ بها في الجزء الدائم السفلي عبر دورة الشعرة) في طور البناء الباكر لكي تزوّد قالَب الشعرة بالذُّرّية (اللون الأحمر)، حيث تنضج معظم خلايا هذه الذُّرّية لتشكّل خلايا صباغية متمايزة (اللون الأخضر). **SC**= خلايا جذعية، **AC**= خلايا متكاثرة، **MC**= خلايا ناضجة. التكبير الأصلي: × 400 **(j)**؛ × 1.000 **(k-m)**.

منطقة الانتفاخ هي غير ناضجة (الشكل 4j-l، ونتائج غير معروضة). وعند الانتقال من طور النهاية إلى طور البناء، يرتفع مستوى التعبير عن lacZ في سلالة الخلايا الميلانينية ويزداد حجمها (الشكل 4a,b) ثم تنقسم في النهاية (الشكل 4c). وتبقى في منطقة الانتفاخ خلية واحدة $lacZ^+$ على الأقل (الشكل 4d-g). وهناك خلايا أخرى، محاطة بالمنطقة المولّدة للشعرة النامية، تمدّ استطالاتها باتجاه الحليمات الجريبية follicular papillae (الشكل 4d,f,m). ويتمُّ الفصل ما بين هاتين الجماعتين من الخلايا بعيداً عن بعضهما البعض في الجريب المتشكّل (الشكل 4f,g). وتتوضَّع خلايا المجموعة الأخيرة هذه في قالَب الشعرة وتقوم بانقسامات خلوية وتتمايز لتعطي خلايا ميلانينية مصطبغة (الشكل 4f,g, h).

إن سلوك الخلايا الموصوف أعلاه، إضافةً إلى تجارب الاحتفاظ بـBrdU وتجارب إعادة تشكيل الجريبات، يبرهن على أن الخلايا الأرومية الميلانينية الموجودة في الجزء الدائم السفلي هي خلايا غير متمايزة وبطيئة التكاثر الخلوي، وأنها تحافظ على نفسها ذاتياً، وأنها تزوّد قالَب الشعرة بأعدادٍ كبيرة من ذرّيتها المتمايزة. وتحقّق هذه الخصائص معيار الخلايا الجذعية [13]. وفي حين أننا لم نكشف إلا خلية واحدة إلى بضع خلايا $lacZ^+$ فقط في منطقة الانتفاخ لجريبات الشعر السفلي، فقد وجدنا خلايا أكثر في منطقة الانتفاخ أو ما تحتها مباشرةً لجريبات الشعر العلوي. يبدو أن هذا الجزء السفلي الدائم، والذي يقوم بوظيفة العش للخلايا الجذعية الميلانينية، يتغيّر في الحجم من نمطٍ شعري إلى آخَر، ولكنه يتوضَّع دائماً أو مباشرةً تحت العش الخاص بالخلايا القيراتينية الجريبية.

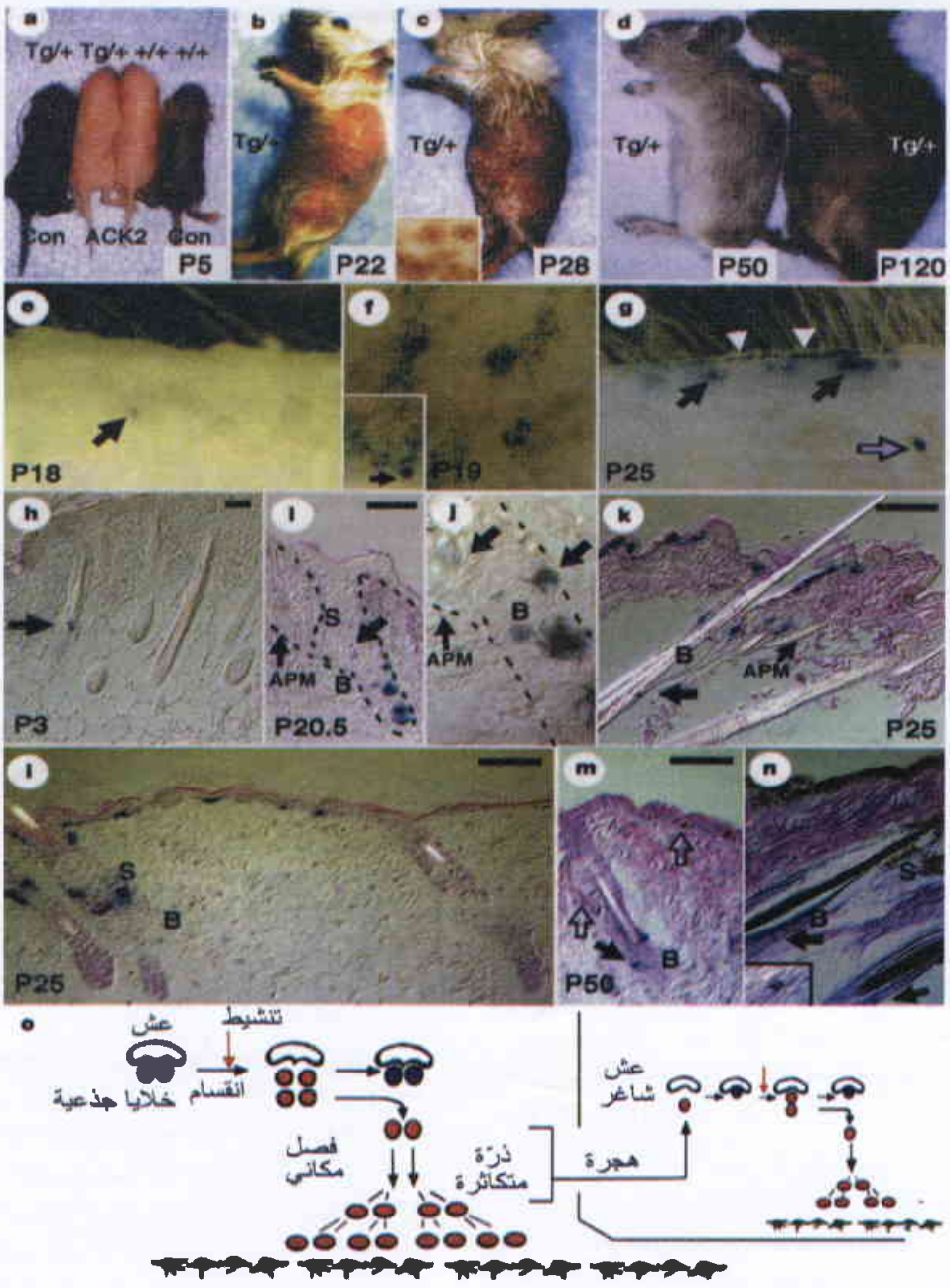
تقترح الملاحظات المذكورة أعلاه اشتراك عوامل خارجية المنشأ في فصل مقصورة الخلايا الجذعية عن المقصورات الأخرى. وبالفعل، تتكاثر ذرّيّة الخلايا الجذعية الميلانينية في قالَب الشعرة المحاذي للحلمات الجريبية التي يتم فيها التعبير عن عامل steel (steel factor = SF) (الذي هو رباط للمستقبلة Kit) [28]. وتتّصف الفئران المحوّرة وراثياً التي يتمُّ فيها التعبير المستمر عن البروتين SLF بواسطة محضضة القيراتين keratin (K14) في الخلايا القيراتينية القاعدية، بجلد مصطبغ شبيه بجلد الإنسان الذي يركّب البروتين SLF أيضاً في البشرة. وباستخدام الفئران المحوّرة وراثياً (k14-SLF/+) K14-SLF، كنّا قد برهنّا سابقاً على أن التعبير عن SLF بحدّ ذاته فقط كاف لتزويد البشرة البين- جريبية بالمقدرة على قبول ودعم وجود الخلايا الميلانينية [29].

من أجل تحديد مكان وجود "خزّان" الخلايا الميلانينية في البشرة، قمنا باستنفاذ المقصورة المعتمدة على البروتين Kit من جلد فئران محوّرة وراثياً K14-SLF/+ و Dct-lacZ/+ (التي سندعوها هنا بـ+/Tg)، وذلك بمعالجة الفئران حديثة الولادة بالضد ACK2، ومن ثم دراسة نموذج إعادة الاصطباغ الناشئ. وأظهرت الحيوانات المعالَجة شعراً أبيضَ (الشكل 5a-c) وجلداً أبيضَ (الشكل 5a). وتمَّ الاحتفاظ بالخلايا $lacZ^+$ حصراً في منطقة انتفاخ الجريبات المتشكلة باكراً؛ أي جريبات الشعر الظهري (الشكل 5h) وجريبات الشعر الحساس البطني (الشكل 5e) خلال أول دورة للشعرة، وهو ما يتطابق مع النموذج المتشكل لدى الحيوانات +/+ و Dct-lacZ/+ المعالَجة بالضد ACK2 (الشكل 1g). وهكذا، فإن المعالجة بالضد ACK2 أدّت إلى تشكّل عدد كبير من الأعشاش الشاغرة في كل من الحيوانات +Tg/+ و+/+. ومما أكّد غياب خلايا أرومية ميلانينية وظيفية في هذه الجريبات هو أننا وجدنا أن جميع الشعرات المتشكّلة في هذا النمط من الجريبات تقريباً كانت غير مصطبغة في دورة الشعر التالية (الشكل 5d إلى اليسار، m). وبالمقابل، فإن الجريبات المتشكّلة باكراً التي تحتفظ بالخلايا الأرومية الميلانينية في منطقة الانتفاخ، تعطي شعراً مصطبغاً. وتجدر الملاحظة أنه يبدو لدى الفئران +Tg/+ أن إعادة اصطباغ البشرة تبدأ انطلاقاً من مثل هذه الجريبات (الشكل 5b, c, f).

قمنا بدراسة عملية إعادة الاصطباغ لدى الفئران +Tg/+ باستخدام التلوين الناتج من وجود أنزيم β-galactosidase في مجمل الجلد. في الجلد البطني، تمَّ الكشف عن الخلايا الأرومية الميلانينية في الجزء الدائم من جريبات الشعر الحسّاس (المشار إليه بسهم) في اليوم P18 وP19 بعد الولادة (الشكل 5e, f (المستطيل الصغير))، وكانت بعض هذه الخلايا موجودةً في البشرة المحيطة بهذه الجريبات (الشكل 5f). وبالفعل، أظهر الفحص النسيجي لجلد لفئران +Tg/+ أنه يمكن لذُرية الخلايا الأرومية الميلانينية الحيّة في منطقة الانتفاخ أن تهاجر للأعلى باتجاه البشرة بوجود البروتين SLF (الشكل 5 k-i). تشير هذه النتائج إلى أن الخلايا الجذعية في منطقة الانتفاخ هي منشأ الخلايا الميلانينية في البشرة. وظهرت أعدادٌ متزايدة من الخلايا $lacZ^+$ في البشرة مشكّلة نموذجاً حلقياً متمركزاً حول الجريبات (الشكل 5f). وكانت هذه الخلايا تمرُّ بعملية تمايز مؤديةً إلى تشكل بقع مصطبغة في الجلد (الشكل 5b)، وكانت هذه البقع تكبر مع مرور الزمن وتندمج (الشكل 5c). وتقترح هذه الملاحظات أن التعبير عن البروتين SLF في البشرة يفتح دروباً جديدة تصل ما بين غمد الجذر الخارجي (ORS) والبشرة، حيث تتمكن الخلايا الأرومية الميلانينية من الهجرة على هذه الدروب (الشكل 5f, g). وباستخدامها هذا الدرب، استعمرت الخلايا $lacZ^+$ في النهاية مجمل منطقة الانتفاخ الفارغة للجريبات على الجلد بكامله خلال بضع دورات شعرية (الشكل 5d, m, n، ونتائج غير معروضة).

يشير مجمل هذه العملية إلى أن جماعة من ذُرّية الخلايا الجذعية الميلانينية، التي تهاجر خارجةً من العش، تتكاثر خارج العش وتستعمر أعشاشاً شاغرة، وتعمل في النهاية كخلايا جذعية. وبعد استيطانها للأعشاش تعود هذه الخلايا إلى حالة ساكنة ذات أجسام مستديرة وصغيرة للخلية (الشكل 5m, n)، وتتمُّ إعادة تنشيطها في طور البناء التالي الباكر (نتائج غير معروضة). أما الخلايا الأرومية الميلانينية التي تمّت مكاثرتها والتي تستقرّ خارج العش، فتتمايز لتعطي خلايا ميلانينية مصطبغة (الشكل 5m, n). وفي النهاية يتمُّ استبدال جميع الشعر الأبيض تقريباً بشعر جديد مصطبغ (الشكل 5d، يمين). ومما يثير الاهتمام هو أن النموذج المستعاد للون الفرو في دورة الشعر الثانية بقي بدون تغيير في غياب المورثة المحوّرة K14-SLF (الشكل 1d يسار، ونتائج غير معروضة). وبما أن استعادة اللون (الشكل 5) كانت قد انطلقت من 2% من جريبات الجلد البطني لدى الفئران المحوّرة +Tg/+، فإن الذُرّية المكاثِرة من هذه الجريبات قامت بتشكيل 50 ضِعفاً من أنظمة الخلايا الجذعية الجديدة في الجريبات الشاغرة المحيطة، ممّا يشير إلى القدرة الفائقة لهذه الخلايا في حفاظها الذاتي على نفسها. وحسب نموذج المقصورة [8]، فإن الذُرّية المتكاثِرة التي

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 5– الخلايا الجذعية تستعمر أعشاشاً فارغة. عُولجت الفئران المزدوجة التحوير الوراثي K14-SLF, Dct-lacZ (المختصرة بـ Tg/+) (**n-a**) والفئران المحوّرة وراثياً Dct-lacZ (المختصرة بـ+/+ في **a**) بالضد ACK2 بُعيد ولادتها. **d-a**: نموذج الاصطباغ عند الفئران المعالَجة بالضد ACK2. كان نموذج لون الفرو المستعاد بعد تساقط الشعر الأول متطابقاً ما بين الفئران Tg/+ و +/+ (**d**، انظر أيضاً الشكل 1d يساراً). بعد تساقط الشعر الثاني والثالث، أصبح في النهاية جميع الشعر مصطبغاً على جلد الفئران Tg/+ (**d** يميناً)، ولكن ليس على جلد الفئران +/+ (انظر أيضاً الشكل 1d يساراً، ونتائج غير معروضة). **n-e**: التلوين الناجم عن أنزيم β-galactosidase في جلد الفئران Tg/+ المعالجة بالضد ACK2. **g-e** : تُظهر المناظر العامة النموذج الشعاعي لهجرة الخلايا الأرومية الميلانينية من الجريبات التي تحتفظ بالخلايا $lacZ^+$: جريبات الشعر الحساس البطني (**f,e**) وجريبات الشعر الظهري (**g**). مناظر لمقاطع عرضية (**e,f**، المستطيل في **g**) ولسطح الجلد (**f**). تشير الأسهم المملوءة والفارغة إلى الخلايا الميلانينية في القسم الدائم وفي قالَب الجريب على الترتيب. تشير رؤوس الأسهم (**g**) إلى الخلايا الميلانينية المنتشرة في البشرة. **n-h**: الفحص النسيجي لتوزّع الخلايا $lacZ^+$ المنتشرة إلى الجريبات المحاذية. في دورة الشعر الأولى توجد الخلايا $lacZ^+$ في منطقة الانتفاخ لجريبات الشعر الظهري (**h**). وخلال دورة الشعر الثانية وُجدت الخلايا $lacZ^+$ في الجزء الدائم العلوي لقالَب الجريبات (**i, j**) وبعد ذلك في البشرة المحيطة أيضاً (**k**). وقد وجدنا أيضاً حدوداً ما بين الجلد الذي تمّ استيطانه والجلد الذي لم يتم استيطانه (**I**). في حين أنه، مباشرةً بعد الاستيطان، لم تكن الخلايا الأرومية الميلانينية الموجودة في البشرة و في الجزء الدائم العلوي قد اصطبغت بعد (**I**)، فقد اصطبغت هذه الخلايا في النهاية (**m**، الأسهم الفارغة) وقامت بإمداد الخلايا القيراتينية بحبيبات الميلانين (**n**، اليوم P120). لاحظ أن الخلايا $lacZ^+$ (الإيجابية التلوين $lacZ^+$ والسلبية الاصطباغ بالميلانين melanin -) (الأسهم المملوءة والمربّع) توجد في منطقة الانتفاخ، ولكن ليس هناك أي وجود لخلايا مصطبغة في هذه المنطقة. S= الغدة الدهنية، APM= العضلة الناصبة للشعرة، B= منطقة الانتفاخ، D= الجلد الظهري، V= الجلد البطني. شريط المقياس = 50 مكرومتر. **o**: نموذج للخلايا الجذعية قائم على نظريّة العش. بالأزرق : خلايا جذعية، بالأحمر : ذُرّية متكاثرة، بالأخضر: خلايا ناضجة.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

هاجرت خارجةً من العش قد تنطبق على "مقصورة التكاثر المؤقّت". وتشير نتائجنا إلى أنه يمكن لبعض الخلايا الميلانينية في هذه المقصورة الرجوع إلى مقصورة الخلايا الجذعية عندما تستوطن في "العش".

لقد كشفنا عن الخلايا الجذعية الميلانينية في الجزء السفلي الدائم من جريبات الشعر، وأظهرنا المقدرة التشكيليّة الكبيرة لهذه المنطقة في لعب دور العش الذي يتحدَّد فيه مصير ذُريّة الخلايا الجذعية المتكاثرة كخلايا جذعية (الشكل5o). إن عملية إعادة الاصطباغ التي لاحظناها توحي بقوة أن الخلايا الأرومية الميلانينية البَشَرية الموجودة في غمد الجذر الخارجي (ORS) هي منشأ الخلايا الجذعية المولّدة للخلايا الميلانينية لقالب الشعرة وللبشرة. وبالفعل، يذكّرنا نموذج الاصطباغ هذا بعملية الشفاء عند مرضى البُهاق (vitiligo= بقع بيضاء على الجلد)، وهو مرض مكتسب يتّصف بفقدان الخلايا الميلانينية [30].

الطرائق

الحيوانات ومعالجتها بالأضداد

حصلنا على الفئران ROSA 26 (C57BL6) من مخبر Jackson. وحصلنا على الفئران OF1 (البرصاء) وعلى الفئران عديمة الغدة التوتية (nu/nu) من Iffa Credo. الفئران المحوَّرة وراثياً Dct-lacZ و K14-SLF والضد ACK2 كان قد تمَّ وصفها سابقاً [19, 7, 5] عُولجت الفئران حديثة الولادة بـ 0.2 ملّي غرام من الضد ACK2 بحُقن تحت- جلدية في الأيام P0 و P2 و P4 بعد الولادة.

اختبار أنزيم β-galactosidase

غُمِرت عينات الجلد المأخوذة من الفئران المحوَّرة وراثياً Dct-lacZ في سائل التثبيت (2% فورمالدهيد، 0.2% جلوتار ألدهيد، 0.02% Nonidet P40، في موقٍ ملحي فسفاتي (PBS) pH 7.4، وشُعّت لمدة 20 ثانية في فرن ميكروويف استطاعته 600 واط وحُفظت على الثلج لمدة 60 دقيقة. وتمَّ تلوين العينات في محلول المركّب indolyl-B-D-galactoside المهلجَن (Bluo-Gal, Gibco-BRL). أما المقاطع المجمّدة فجأةً فقد تمَّ تثبيتها لاحقاً ولوّنت تلويناً مضاداً بـ eosin وشوهدت بالمجهر التداخلي التفاضلي.

الكيمياء المناعية النسيجية

غُمِرت عينات الجلد في محلول 2% بارافورمالدهيد / PBS (pH 7.4) وشُعّت لمدة 60 ثانية في فرن ميكروويف استطاعته 600 واط بدرجة حرارة 4°C. وتمَّ تغليف الجلد المثبّت بمادة OCT ثم جُمّدت العينات فجأةً. وبالنسبة للتلوين الوميضي المناعي المضاعَف، عُولجت مقاطع تبريد بحجم 14 مم بالمحاليل التالية : PBSMT (2% بودرة حليب منزوع الدسم و 0.1% v/v Triton X-100 في PBS) لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة؛ الضد الجرذي المضاد للبروتين Kit (ACK2) بتركيز $10\ mg\ ml^{-1}$ (1:100) أو الضد الفأري المضاد لـ BrdU (Becton Dickinson) (1:5) المربوط بـ fluorescein (FITC) isothiocyanate، والضد الأرنبي المضاد للأنزيم β-galactosidase (Cappel) (1:900) محلولاً في PBST 0.1% v/v Triton X-100 في PBS وذلك خلال ليلة كاملة؛ الضد مضاد الأرنب المربوط بـ Alex594 (Molecular Probes) (1:200) والضد مضاد الجرذ المربوط بـ FITC (Molecular Probes) (1:450) (فقط من أجل التلوين بالضد ACK2) في محلول PBST لمدة ساعتين. وغُسلت العينات ثلاث مرات بـ PBST بعد كل مرحلة من التلوين ثم رُفعت على الصفائح الزجاجية في مادة بطيئة التلاشي الوميضي (مسابر جزيئية). تمَّ التقاط الصور بواسطة منظومة تصوير تطابقي محرقي بالمسح الليزري MRC-1024 (Bio-Rad).

الازدراع

أُجري الازدراع كما هو موصوف سابقاً [9]. باختصار، استُؤصلت جريبات الشعر الأنفي من الفئران ROSA 26 بعملية تشريح دقيقة وقُطّعت إلى أجزاء ثم زُرعت على الجلد الخلفي للفئران البرصاء المولودة حديثاً مرفقةً بفحم نباتي أسود عقيم. وروقبَت الجراء المتعرّضة لعملية الزرع حتى اليوم P5 بعد الولادة. تمَّ تجميع مناطق الجلد المحتوية على الأجزاء المزروعة، والتي تمَّ التعرف عليها بفضل وجود الفحم، وتمَّ زرعها على ظهر فئران عديمة الغدة التوتية (Swiss-nu/nu) لتفادي رفضها مناعياً. تمَّ اختبار تشكّل الجريبات الهجينة (ROSA 26- OF1) بواسطة تلوين الجلد المعتمد على أنزيم β-galactosidase.

المراجع

REFERENCES

[1] Schofield et al. The relationship between the spleen colony-forming haemopoitic stem cells. Blood Cells 4,7-25 (1978).

[2] Watt & Hogan. Out of Eden : stem cells and their niches. Science 287, 1427-1430 (2000).

[3] Xie & Spradling. A niche maintaining germ line stem cells in Drosophila ovary. Science 290, 328-330 (2000).

[4] Slominski & Paus. Melanogenesis is coupled to murine anagen : toward new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth. J. Invest. Dermatol. 101, 90s-97s (1993).

[5] Mackenzie et al. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in mouse embryo. Dev. Biol. 192, 99-107. (1997).

[6] Jordan & Jackson. A late wave of Melanoblast differentiation and rostrocaudal migration revealed in patch and rump-white embryos. Mech. Dev. 92, 135-143 (2000).

[7] Kunisada et al. Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor. J. Exp. Med. 187, 1565-1573 (1998).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[8] Cotsarelis et al. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilocebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell 61, 1329-1337 (1990).

[9] Oshima et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell 104, 233-245 (1993).

[10] Lavker et al. Hair follicle stem cells: their location, role in hair, and involvement in skin tumor formation. J. Invest. Dermatol. 101, 16s-26s (1993).

[11] Chase. Critical stages in hair development. Physiol. Zool. 24, 1-8 (1951).

[12] Tobin et al. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? J. Invest. Dermatol. 111, 941-947 (1998).

[13] Loeffler & Potten. in Stem Cells (ed. Potten) 5-6 (Academic, London, 1997).

[14] Silver et al. Melanocyte precursor cells in the hair follicle germ during the dormant stage (telogen). Experientia 25, 299-301 (1968).

[15] Cock & Cohen. The melanoblast reservoir available to a feather papilla. Embryology 6, 530-545 (1958).

[16] Sugiyama. Mode of differentiation and melanogenesis of melanocytes in mouse hair follicles. An ultrasound and cytochemical study. J. Ultrastruct. Res. 67, 40-54 (1979).

[17] Slominski et al. Pharmacological disruption of hair follicle pigmentation as a model for studying the melanocyte response to and recovery from cytotoxic drug damage in situ. J. Invest. Dermatol. 106, 1203-1211 (1996).

[18] Botchkareva et al. SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. FASEB J. 15, 645-658 (2001).

[19] Nishikawa et al. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody : two distinct waves if c-kit-dependency during melanocyte development. EMBO J. 10, 2111-2118 (1991).

[20] Okura et al. Effects of monoclonal anti-c-kit antibody(ACK2) on melanocyte in newborn mice. J. Invest. Dermatol. 105, 322-328 (1995).

[21] Ogawa et al. Expression and function of c-kit in fetal hemopoietic progenitor cells : transition from the early c-kit-dependent to the late c-kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. Development 117, 1089-1098 (1993).

[22] Yoshinaga et al. Role of c-kit in mouse spermatogenesis as a specific site of c-kit expression and function. Development 113, 689-699 (1991).

[23] Mayer. The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. Dev. Biol. 34, 39-46 (1973)

[24] Nishimura et al. Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. Dev. Biol. 215, 155-166 (1999).

[25] Silvers. The Coat Colours of Mice. A Model for Gene Action and Interaction (Springer, New York, 1979).

[26] Mann. Prenatal formation of hair follicle types. Anat. Rec. 144, 135-142 (1962).

[27] Friedlich & Soriano. Promoter traps in embryonic stem cells : a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. 5, 1513-1523 (1991).

[28] Yoshida et al. Neural and skin cell-specific expression pattern conferred by steel factor regulatory sequence in transgenic mice. Dev. Dyn. 207, 222-232 (1996).

[29] Kunisada et al. Transgene expression of steel factor of the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. Development 125, 2915-2923 (1998).

[30] Fizpatrick et al. Vitiligo, in Dermatology in General Medecine 3rd edn (ed. Fizpatrick) 810 (McGraw Hill, New York, 1987).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

نقل نتائج بحوث بيولوجيا الخلايا الجذعية وأسلافها إلى التطبيق السريري: العوائق والحظوظ*

إ. ل. وايزمن
قسم علم الأمراض وبيولوجيا التطور، كلية الطب بجامعة ستانفورد، ستانفورد، الولايات المتحدة الأمريكية.

ملخص

الخلايا الجذعية stem cells هي الوحدات الطبيعية لتولّد الأنسجة الجنينية، والتجدّد عند الفرد البالغ أيضاً، في نسج مختلفة. وازدادت حديثاً قائمة النسج التي تستخدم نموذج التمايز differentiation من خلية جذعية إلى خلية مولّدة، ومن ثم إلى خلية ناضجة، لتضم إضافة إلى الدم نسجاً متنوعة من ضمنها: نسج كلٍّ من الجهاز العصبي المركزي والمحيطي، والعضلات الهيكلية؛ ومن الممكن أن تكون جميع الأعضاء والنسج قد اشتُقت من خلايا جذعية، ولا زالت محتفظة بها. وبما أن أعداد ووظائف الخلايا الجذعية وذُرّياتها منظمة بالاستتباب homeostatically، فإن ازدراعها الطبي يضيف المزيد إلى ترسانة الطبيب لمعالجة الأمراض المستعصية.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية، تمايز، ازدراع، عديدة الإمكانات، متعدّدة الإمكانات، كلّية الإمكانات، أضداد أحادية النسيلة، تطعيم، مورثة ورمية، تجدّد.

بدأ التطبيق الطبي لازدراع الخلايا الجذعية وأسلافها مع تعرُّض السكان المدنيين لجرعات مميتة من الإشعاع في عام 1945. وتمت محاكاة هذا التناذر بتشعيع الفئران، في حين أدّى ازدراع نقي العظم إلى وقايتها من الإشعاع بواسطة تزويدها بخلايا مكوّنة للدم مشتقة من معطي donor-derived hematopoiesis [1–3]. وفي عام 1961، بيّن كلٌّ من تيل Till ومكّولوش McCulloch وجود خلايا طليعية نقوية قادرة على تكوين مستعمرات خلوية متعدّدة السلالات الخلوية الدموية في الطحال [الوحدات المكوّنة للمستعمرات الخلوية في الطحال colony-forming units, spleen (CFU-S)]؛ وكانت مجموعة صغيرة من المستعمرات الطحالية تحتوي على خلايا قادرة على تشكيل المزيد من المستعمرات الخلوية في الطحال. لقد افترضا أن هذه المجموعة الخلوية هي خلايا جذعية مكوّنة للدم عديدة الإمكانات pluripotent hematopoietic stem cells (HSCs) [4–6] يتصف كلٌّ منها على المستوى الفردي بصفتي (i) التجدّد الذاتي و(ii) التمايز إلى سلالات خلوية متعدّدة. ولا زال هذا التعريف هو الأقوى لوصف الخلايا الجذعية.

ومع أن التجارب الموصوفة أعلاه قدّمت الدليل على وجود الخلايا الجذعية، إلّا أنها لم تمكّن من عزلها. ومع تطوير مقايسات كمّية لقياس قدرة الخلايا الطليعية على تشكيل مستعمرات خلوية في الفئران لجميع طلائع الخلايا اللمفية الدموية [7–9]، أمكن تطوير طريقة مختزلة لتحديد وعزل خلايا جذعية مكوّنة للدم عديدة الإمكانيات HSCs. وقد حُدِّدت أضداد أحادية النسيلة monoclonal antibodies (mAb) يمكنها الارتباط إلى واسمات موجودة على سطوح بعض، وليس كلّ، الخلايا السلف للدم؛ وأمكن عزل مجموعات الخلايا الموجبة للواسم والخلايا السالبة له بطريقة الفرز الخلوي (على سبيل المثال بالفرز الخلوي الفعّال بالفلورة) لتحديد الخلايا التي لها فعّالية طليعية والقادرة على تشكيل مستعمرات خلوية [9]. تبيّن في النهاية أن الخلايا السلف المتعدّدة الإمكانات المشكّلة للمستعمرات، والتي تبدي مظهراً متميزاً، هي خلايا HSCs (الشكل 1A) [10–13]. وهنالك جزء من هذه المجموعات الخلوية يقوم بالتجديد الذاتي الدائم والمستمر، دعيت بالخلايا الجذعية طويلة الأجل [12، 14]. وكانت جميع هذه المجموعات من HSCs موقية إشعاعياً، وكانت HSCs العناصر الوحيدة الموقية إشعاعياً الموجودة في نقي عظم الفئران [11]. وتبيّن أنه كلما ازدادت جرعة الخلايا HSC كلما قصُر الزمن اللازم للتطعيم engraftment بأعداد خلايا دموية واقية سريرياً مشتقة من خلايا المعطي (الشكل 1B) [15]. وأخيراً طوّرت مقايسات لتحليل الخلايا الجذعية البشرية والسلف للمستعمرات والخلايا السلف للخلايا اللمفية في الزجاج in vitro وفي الحي in vivo على السواء، كما عُزلت باستخدام هذا النهج الخلايا المرشحة كخلايا HSCs عند الإنسان [16، 17].

كانت خلايا HSCs للإنسان والفأر الممثلة في الشكل 1A، الأولى التي عُزلت بواسطة الواسمات السطحية. وتبيّن لاحقاً وجود تحت جماعات من خلايا LT-HSC بعضها من النمط $CD34^+$ ومجموعات نادرة جداً تكون من النمط $CD34^-$ [18, 19]؛ تنبذ خلايا HSC أصبغة مثل Hoechst 33324 وRhodamine 123 بفعّالية، وقد استُفيد من هذه الخاصّية في عزل تلك الخلايا [20]. ويُحدِّد الضد أحادي النسيلة AC133 عند الإنسان خلايا HSC أيضاً [21].

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Science*, Vol 287, 25 February 2000. ترجمة الدكتور عدنان الاختيار – هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

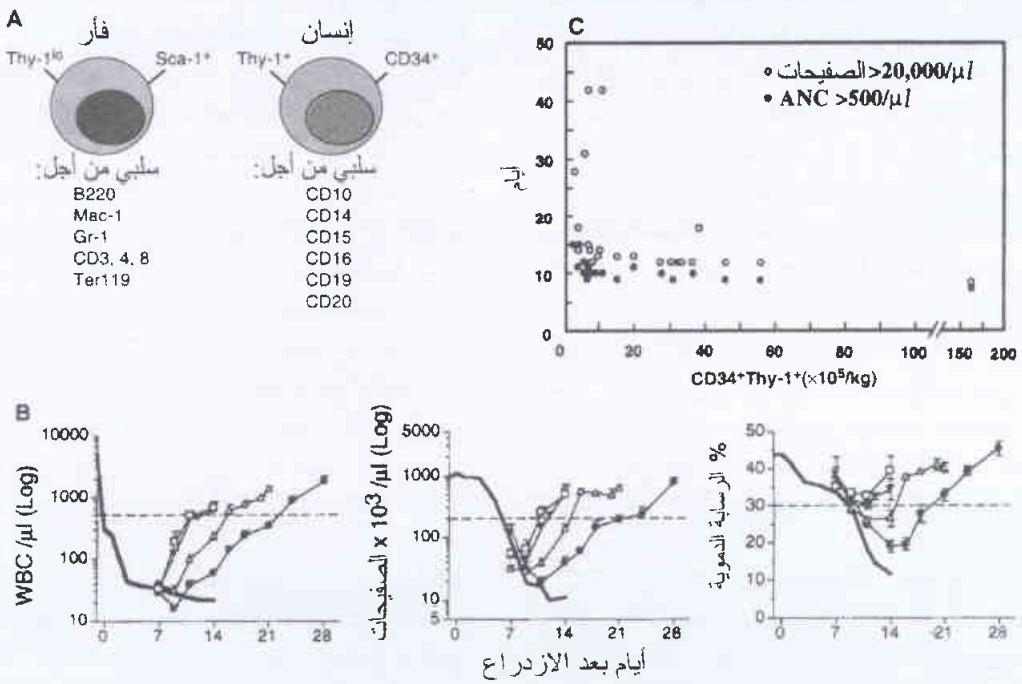
تكون خلايا HSC البشرية المنقّاة قادرة على إعادة تكوين خلايا الدم لدى المرضى الذين يتلقّون جرعات أشعة أو جرعات كيميائية تقضي على الخلايا النقوية (Myeloablative). وتقصّر زيادة جرعة الخلايا HSC من الزمن اللازم لتطعيم عناصر الدم الناضجة عند الإنسان والفئران (الشكل 1C) [22-24].

بيولوجيا الخلايا الجذعية وأسلافها للدم

تنشأ عن الخلايا الجذعية المديدة العمر LT-HSCs في الفئران خلايا جذعية قصيرة العمر (ST-HSCs)، وتنشأ عن هذه الخلايا المؤقتة الخلايا السلف المتعدّدة الإمكانات (MPPs)، والتي تتكوّن منها لاحقاً ذُرّية (نسل) من السلالات الخلوية القليلة المحددة (الشكل 2) [12]؛ ولا يمكن كشف العودة عن التمايز dedifferentiation [25].

تُصادَف الخلايا HSCs أولاً في الجزر الدموية الموجودة في الكيس المحي yolk sac النامي؛ وأدّى نقل خلايا الجزر الدموية هذه إلى عائل من العمر نفسه إلى تكوّن مديد للخلايا المكوِّنة للدم والمشتقة من خلايا المعطي [26]. يمكن أن تُصادَف الخلايا HSC أيضاً في جسم الجنين [27، 28]. وتكشّفت لاحقاً الخلايا HSC في كبد الجنين [13]، وفيما بعد في طحال الجنين وفي نقي العظم [29]؛ ويبدو أن كلّ مرحلة تحدث على الأغلب بوصول خلايا HSC إلى جهاز الدوران عند الجنين. وتبيّن أن حوالي 8% من جماعة الخلايا الجذعية المديدة العمر LT-HSC في الفئران الفتية البالغة يدخل يومياً بانقسام خلوي وبشكل عشوائي، ووسطياً نصف الخلايا الناتجة من هذه الانقسامات يجب أن يكون خلايا LT-HSC للمحافظة على مستوى من الثبات. ومع تقدُّم خلايا HSCs نحو الخلايا السلف MPPs، يزداد تواتر الخلايا الداخلة في انقسام خلوي [30، 31]. وتصبح في الفئران الكهلة جميع خلايا LT-HSC في حالة انقسام [32].

تمتلك خلايا HSCs المنقسمة أربعة خيارات تطوّرية هي: التجدّد الذاتي، والتمايز، والموت الخلوي المبرمج، والهجرة [33]. وينظم تواتر الخلايا HSCs في الأعضاء المكوِّنة للدم نسبة الخلايا الجذعية التي تختار واحداً من هذه المصائر. ويؤدي التعبير عن المورثة المضادة للموت الخلوي المبرمج bcl-2 (وهي مورثة ورمية proto-oncogene) المحوّر وراثياً في الخلايا HSC إلى زيادة أعدادها في نقي العظم [34]. تمتلك خلايا HSC هذه مقاومة زائدة للمعالجة الكيميائية والمعالجة الشعاعية، وهي صفة لها قيمتها الطبية الكبيرة لو كان بالإمكان تنظيم التعبير عن المورثة bcl-2.



يحدث انتقال الخلايا الجذعية بين المواقع المكوّنة للدم الأولية بشكل طبيعي طيلة حياة الفرد [35]. ويمكن للإدخال الطبي للسيتوكينات cytokines مثل G-CSF لوحده أو مع العقاقير المخفِّضة للخلايا [36] أن يحرّض على انتقال الخلايا الجذعية إلى الدم (MPB)، حيث تُجمع من أجل ازدراعها. ويبدأ الانتقال الطبيعي والمحرّض لخلايا HSC أولاً بحدوث توسع انقسامي mitotic expansion لخلايا HSC يتبعه تحرُّر خلايا HSC

الشكل 1- (A) الخلايا السلف المتعدّدة الإمكانات القادرة على تشكيل مستعمرات خلوية لها مظهر متميز من الواسمات. وتظهر الأنماط الظاهرة للسطح الخلوي للخلايا HSCs عند الإنسان والفأر. (B) شفاء الخلايا المكوّنة للدم في الفئران المشعّعة من السلالة C57BL/Ka والتي ازدُرعت تكافلياً بجرعات مختلفة من الخلايا HSCs المنقاة بـ 100 خلية (الدوائر المطموسة)، وبـ 1000 خلية (المثلثات المفرّغة)، وبـ 5000 خلية (المثلثات المطموسة)، و بـ 10,000 خلية (المربعات المفرغة). وتمّ عرض حركية شفاء خلايا الدم البيضاء (WBC) والصفيحات الدموية، ونسبة الرسابة الدموية hematocrit. يمثل الخط الأفقي المتقطع مستويات شفاء: الكريات البيضاء إلى 500 كرية/مكرولتر، والصفيحات إلى 200,000 صفيحة/مكرولتر، والرسابة الدموية (الكريات الحمراء) إلى 30% [15]. (C) ازدراع خلايا HSCs بشرية نقية في مرضى يعانون من انتقالات لسرطان الثدي. وتظهر أزمنة التطعيم للخلايا المعتدلات neutrophils [العدد المطلق للخلايا المعتدلات (ANC) يزيد على 500 خلية/مكرولتر] إثر ازدراع خلايا جذعية نقية مكوّنة للدم تتصف بأنها $Thy\text{-}1^+$, $CD34^+$ [22].

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

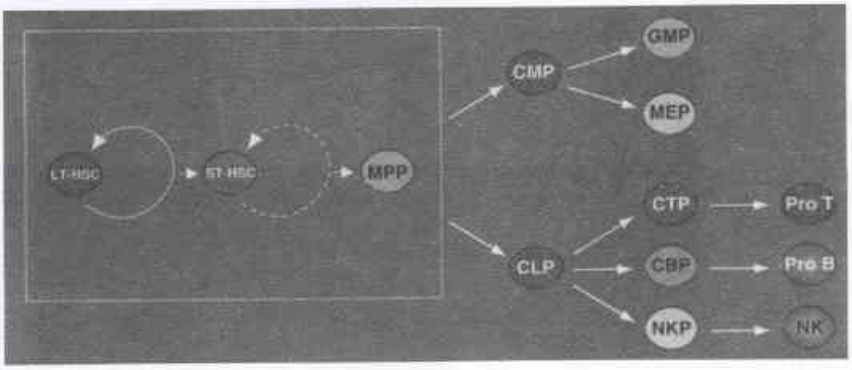
في الطور G_1 من الدارة الخلوية إلى الدم لتنزرع من هناك في مواقع ثانوية [35].

كما عُزلت أيضاً خلايا سلف محدودة الإمكانات والناتجة من خلايا HSC (الشكل 2) [37، 38]؛ إذ تنشأ عن الخلية HSC خلية سلف عامة للخلايا اللمفية (CLP)، أو خلية سلف عامة للخلايا النقوية (CMP). وتنشأ عن الخلية CMP بدورها الخلايا سلف الخلايا العملاقة النواة megakaryocytes، أو الخلايا سلف الكريات الحمراء (MEPs)، أو الخلايا سلف الكريات البيضاء المحبّبة granulocytes والكريات البيضاء أحادية النواة Monocytes (GMPs). ولا يعود أي من هذه الخلايا السلف عن تمايزه ولا يبدي أي منها القدرة على التجدّد الذاتي [37، 38].

توسيع مفهوم الخلية الجذعية والسلف ليشمل نسجاً أخرى

تُعدّ البيضة الملقحة، في الفقاريات، خلية جذعية كلّية الإمكانات totipotent، وكذلك فإن كلّ نسلها من الخلايا المكوّنة لمرحلة التويتة الجنينية blastula stage؛ وخلايا الكتلة الخلوية الداخلية (ICM) للتويتة، يضم (وقد يكون مكوناً من) خلايا جذعية كلّية الإمكانات (TSCs) (الشكل 3) [39]. يمكن اشتقاق الخلايا الجذعية الجنينية (ES) من مستنبتات خلايا ICM، وتمتلك هذه الخلايا صفة المشاركة كخلايا كلّية الإمكانات عندما توضع ضمن أكياس أرومية عائلة. إن المسارات التطوّرية التي تسلكها خلايا ICM وخلايا ES المنقولة لتشكّل النسج والأعضاء قادت الكثيرين ليأملوا بأن هذه المسارات يمكن السيطرة عليها من أجل الحصول على خلايا جذعية لتكوين نسج وأعضاء معينة [40]. ومع ذلك، لا يزال فهمنا قاصراً عن إدراك الأحداث التطوّرية التي تقود إلى تكوّن الأعضاء اعتباراً من خلايا ICM لبرمجة إنتاج خلايا جذعية خاصة بنسيج أو عضو معيّن.

عند الفقاريات، وفي مراحل محدّدة من التطوّر الجنيني، تشارك الخلايا المشتقة من الأدمات الجنينية الثلاث، الأدمة الداخلية والأدمة الخارجية والأدمة المتوسطة، في تكوين النسج والأعضاء. وما ليس بواضح



الشكل 2– نموذج لتمايز الخلية HSC. ينشأ عن خلايا HSCs الفأر نوعان من السلالات الخلوية القليلة المحدّدة هي: الخلايا العامة سلف اللمفاويات (CLPs) [37]، مجبرة على المستوى النسيلي على توليد لمفاويات T ولمفاويات B والخلايا القاتلة الطبيعية (NK)، والخلايا السلف النقوية العامة CMPs [38]، وهي الخلايا سلف السلالات الخلوية النقوية والسلف للكريات الحمراء. تعطي كلّ خلية CMP الخلايا سلف الخلايا النقوية التي ستتمايز إلى أحاديات (GMPs) والخلايا سلف الخلايا العملاقة النوى والسلف للكريات الحمراء (MEPs). وجميع هذه المجموعات الخلوية قابلة للفصل كمجموعات نقية باستعمال واسمات السطح الخلوي [38].

حتى الآن ما إذا كان النموذج العامل الذي تستعمله الخلايا الجذعية والمولّدة للدم هو نفسه الذي يستعمله كلّ نسيج أم لا (الشكل 3). فمن المعقول الافتراض بأن غالبية، إن لم يكن كلّ النسج والأعضاء، قد تشكّلت أساساً وفق نموذج معيّن من خلايا جذعية وسلف أثناء تكوّن الأعضاء وأن هذه الخلايا الجذعية تبقى طيلة الحياة لتشارك في التجديد والإصلاح. وإذا ما صحّت هذه المقولة يستتبع ذلك إمكانية الإفادة من الدروس المستقاة من تجدّد وإصلاح المنظومة المكوّنة للدم في إعادة تكوين وإصلاح بقية الأعضاء.

تكمن قيمة استعمال خطة الخلايا الجذعية والسلف من الجسم نفسه في تجديد العضو في أن أعدادها ومصائرها تكون منظّمة. فمن غير الممكن مثلاً نقل الكثير من خلايا HSC، والتجدّد الناتج من هذه الخلايا هو تكوين منظّم للدم. إن ميزات المعالجة بازدراع الخلايا الجذعية أو السلف هي: (i) أن لا حاجة لفهم تفاصيل العملية كشرط لتطبيق المعالجة، (ii) أن الخطورة السمّية للمعالجة المطبّقة توجد فقط خلال الطور الحاد من تحضير العائل المضيف لتقبل طعوم الخلايا الجذعية والسلف، و (iii) أن المعالجة تطبّق لمرة واحدة فقط. وعلى العكس من ذلك، يكون للمعالجات الطبية– التي تعتمد على استعمال مواد كيميائية تؤثر على أهداف جزيئية داخلية– تأثيرات سمية عادة، وتأثيرات أينما تمّ التعبير عن تلك الجزيئات المستهدفة؛ وإن هذه المعالجات بطبيعتها مزمنة وملازمة طالما بقي المرض موجوداً.

عُزلت الخلايا الجذعية للعرف العصبي من الجرذ [41]. وباستعمال طريقة الترميم المكوّن للنسائل النسخي clonogenic reconstitution في مستنبتات الخلايا العصبية المتعدّدة السلالات في الزجاج كمقايسة، قمنا بإغناء الخلايا الجذعية العصبية المرشحة من دماغ جنين بشري (CNS-SCs) [42]. وتمّ إثبات وجود الخلايا الجذعية العصبية للدماغ CNS-SCs بوسم الخلايا بفيروسات قهقرية retrovirus [43]. أعطى ازدراع الخلايا الموسومة نسيلياً clonally-marked عصبونات ودبقاً عصبياً وحدّد مصائرها الخلوية الوسط الموضعي الدقيق microenvironment في الجملة العصبية المركزية CNS [44]. قد يحدث التكوّن المستمر للعصبونات في دماغ الفرد البالغ في أوساط دقيقة محدّدة مثل منطقة التلفيف المسنن dentate gyrus والحزام تحت البطيني [45]. يمكن لخلايا CNS-SC على مستوى خلايا مفردة أن تكوّن كتل كريات عصبية من أنماط خلوية عصبية عديدة؛ ويمكن عزل الأعداد المتزايدة من الخلايا في الكريات العصبية مستقبلاً وتكون الطلائع السلف للمستعمرات من الكريات العصبية [42]. ويمكن ازدراع الكريات العصبية هذه في الفئران حديثة الولادة ناقصة المناعة أو في الجرذان البالغة المكبوتة مناعياً، حيث تسهم في التكوّن العصبي للعصبونات والدبق العصبي.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

وفيما يخص تكوّن العضلات الهيكلية، فإن الخلايا الجذعية المرشحة لذلك حالياً هي الخلايا التابعة [46]. وقد تمّ الإغناء بطلائع الخلايا المكوّنة للأوعية الدموية [47]، والخلايا المولّدة للجلد [48]. ونُشرت نتائج عديدة غير عادية عن ازدراع هذه الخلايا: حيث حُصِل على خلايا دموية من مستنبتات خلايا كريات عصبية نسيلية [49]، وكذلك حُصِل على خلايا دم مشتقة من طلائع مولّدة للخلايا العضلية (على الأغلب من الخلايا التابعة) [50]، وحُصِل على خلايا مكوّنة للعضلات وخلايا مكونة وعائية من طلائع خلايا دموية ونقوية [51، 52]، وحُصِل حتى على مشاركة الخلايا المكوّنة للدم في تكوين خلايا عصبية [53] أو تكوين الكبد [54]. ومن غير الواضح كيفية حدوث ذلك. والتزاماً بأغراض هذه المراجعة، يبدو أن الوسائل التي من خلالها تغيّر الخلايا الجذعية الخاصّة بالأعضاء مصيرها على صلة بمدى كون هذه الخلايا مصادر محتملة لزيادة أعداد الخلايا من أجل الازدراع [55، 56].

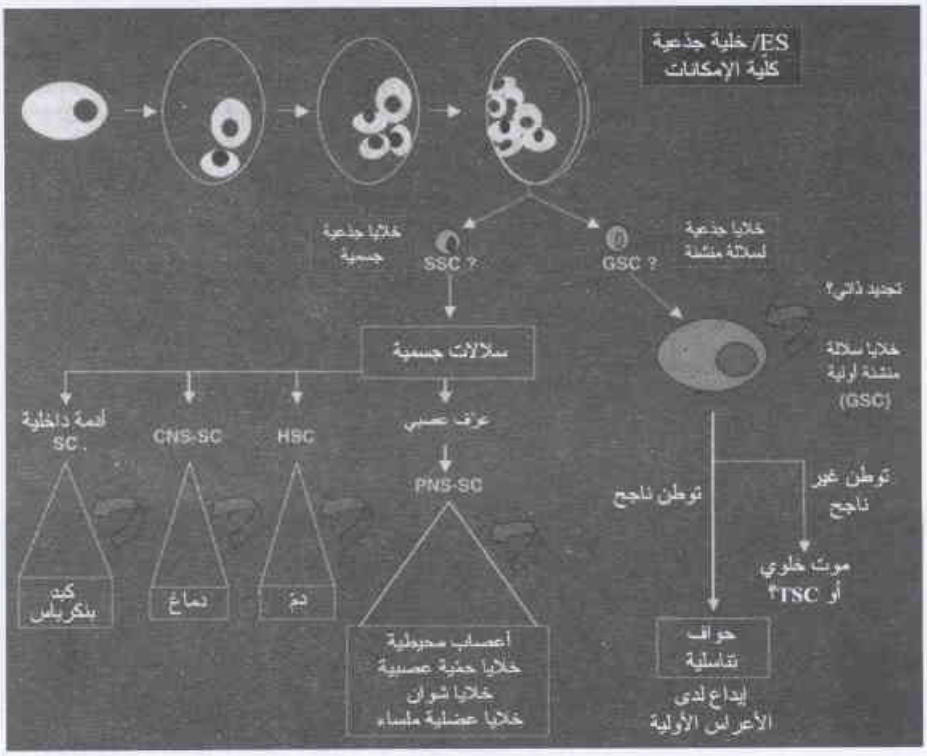
المعالجة الطبية بازدراع الخلايا الجذعية والسلف

الممارسات الحالية، والمعوقات التي تحدّ من إنجازها، وفرص النجاحات

تكوّن الدم كنموذج لازدراع الخلايا الجذعية والسلف: ابتُكر ازدراع نقي العظم لتمكين الأطباء من زيادة شدة جرعات المعالجة الكيميائية والمعالجة الإشعاعية للوصول إلى حد القضاء على الخلايا النقوية بهدف القضاء على الخلايا السرطانية الداخلية المنشأ. وكانت عمليات الازدراع الناجحة الأولى بين التوائم المتماثلة، حيث لا يوجد عائق التوافقية النسيجية بين الآخذ والمعطي، ولا توجد فرصة لحدوث رد فعل مناعي ضد الطعم المزروع [57].

طعوم نقي العظم الذاتي autologous BM أو طعوم الخلايا الدموية السلف متعدّدة الكفاءات MPB: استُعملت طعوم نقي العظم الذاتية لدى العديد من مرضى السرطان، ومن ضمنهم مرضى سرطان الدم (اللمفومات والابيضاضات)، وسرطان الخلايا البلازمية (سرطان نقي العظم المتعدّد multiple myeloma)، وسرطان الثدي [58]. ولكن حتى وإن كانت هذه الأورام حسّاسة للمعالجة الكيميائية، فإن جزءاً فقط من هؤلاء المرضى يُشفى. لماذا؟ أولاً، في العديد من المرضى ينكس المرض في الموقع الأولي له؛ وبالتالي فإن مستوى المعالجة في العديد من المرضى لا يقضي على الورم الأصلي بشكل نهائي. ثانياً، يكون نقي العظم والخلايا الدموية السلف المتعدّدة الكفاءات MPB في المرضى المصابين بهذه الأورام على الأغلب ملوّثة بخلايا سرطانية [59]. وبدون التخلّص من هذه الخلايا السرطانية القادرة على التناسخ تبقى فوائد المعالجة بجرعات كيميائية مرتفعة محدودة، لأن إعادة إدخال الخلايا الخبيثة إلى الدوران تلغي التأثير المتوقع من تلك الجرعات.

قد يؤدي عزل الخلايا الجذعية الدموية HSC البشرية $CD34^+Thy^+$ من خلايا MPB إلى التخلّص من خلايا سرطان نقي العظم المتعدّد الخبيثة [23، 60]، وخلايا سرطان الثدي [22]، وخلايا اللمفوما [24] من الطعوم المزدرعة. في الدراسة المعروضة في الشكل 1C، كان عدد الخلايا الورمية الخبيثة المصاحبة للطعم تحت مستوى الكشف؛ وتبدو الدراسات السريرية الإضافية باستعمال خلايا HSC وMPB جديرة بالمحاولة [وألفت انتباه القارئ إلى أنني كنت من المشاركين في تأسيس شركة SyStemix, Inc التي بدأت بإجراء هذه الدراسات، ولذلك قد أكون متحيزاً]. من المرجّح أن الشفاء من الأمراض الخبيثة بطعوم HSC لن يحدث إلّا إذا عولج المرضى وهم في المراحل الأولى من المرض، أو إذا أخضِع المرضى إلى معالجات مساعدة. إن أحد اتجاهات المعالجات المساعدة هو في النهاية محاولة تجديد أو ترميم الاستجابة المناعية حتى حدود كمّية صغيرة من الخلايا الورمية المتبقية. ويمكن بالنسبة للعديد من الأمراض تحريض المناعة وبشكلٍ أساسي على أساس المناعة المتعلّقة بالخلايا T-. وتستطيع المناعة التي تتوسطها الخلايا T تحسّس مستضدات ورمية فريدة أو ببتيدات لها صلة بالأورام مشتقة من بروتينات نوعية بالخلايا المتمايزة ومعروضة على السطح



الشكل 3– نموذج توليد خلية جذعية كلّية الإمكانات لسلالة منشئة وخلايا سلف جسمية. يمكن للخلايا TSC أن تتفرّع إلى خلايا سلالة منشئة (GSCs) وإلى خلايا جذعية لنسج معيّنة، وربما مروراً بتكوّن خلية جذعية جسمية عامة افتراضية (SSC). الخلايا الجذعية الخاصّة بعضو أو نسيج معيّن في الناحية اليسرى من الشكل هي مجموعات خلوية يُفترض بأنها الخلايا الأولية التي ستستعمل في الازدراع الطبي. في الجهة اليمنى من الشكل المجموعات الخلوية TSCs التي قد تكون مفيدة كطلائع خلايا جذعية لأعضاء ونسج معيّنة.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الخلوي للمفاويات مرتبطة بجزيئات معقّد التوافق النسيجي (HLA الذات) [61]. إن مستقبلات الخلية T النوعية لمستضد، على سبيل المثال: جزيئات HLA-A2 والببتيد الورمي الميلانومي المغلّف MAGE، هي مكوّنات ذاتية تحتفظ بنوعيتها بغض النظر عن أي من الخلايا T التي تعبّر عنها، وهذا يفسح المجال لإمكانية تحوير مورثة مستقبل الخلية التائية TCR بحيث تولّد مناعة مضادة للورم. إن جمع الخلايا T التي تميز نوعاً معيناً من جزيئات HLA مرتبطاً إلى ببتيد ورمي يمكن كشفه وعزله بتقانة جديدة لإنتاج معقّدات متفلورة لمعقّد التوافق النسيجي الكبير (MHC) المكوّن من ببتيد رباعي القطع [62]. ويمكن تحوير المورثة TCR في خلايا HSC وخلايا CLP وخلايا T وعزل خلايا T على أساس معقّد MHC مع الببتيد الرباعي القطع لمعقّد MHC من ازدراع مكوّن نوعي خاص بترميم مناعي لدى المرضى الذين لديهم بقية المرض عقب ازدراع طعم HSC. تشمل الاستراتيجيات الإضافية لزيادة أثر هذه المعالجات بخلايا مناعية استعمال لقاحات من خلايا ورمية محوَّرة وراثياً [63]، أو زيادة وإدامة الرد المناعي للخلية T المضادة للورم بإبقائها في حالة تفعيل [64].

ازدراع طعوم متخالفة من خلايا مكوّنة للدم غير ذاتية المنشأ

للطعوم المتخالفة المكوّنة للدم فائدة كبيرة في معالجة السرطان لأنها غير ملوّثة بخلايا ورمية، ومن المؤسف أن نقي العظم والخلايا الدموية السلف المتعدّدة الكفاءات تضم لمفاويات T [58، 65]. تجابه الخلايا T من المتبرع (المعطي) وتستجيب لمستضدات الآخذ في كلّ نسج الجسم تقريباً، متسبّبة بحدوث متلازمة الطعم مقابل المضيف الجهازي المتعدّد (GvH) [58]. ويرفض الجسم الطعوم المكوّنة للدم غير المطابقة لجزيئات HLA الذات [66]. إن التعددية الشكلية الوراثية المرتفعة في جزيئات HLA تجعل التطابق العشوائي في جزيئات HLA بين البشر غير الأقرباء حدثاً نادراً [58]. إن احتمالية التطابق في جزيئات HLA بين الأخوة هي 25%. ولأن جزيئات MHC تُعالِج وتعرض أياً من الببتيدات العديدة الموجودة ضمن الخلية، فإن الأخوة الذين يتشاركون بجزيئات HLA قد لا يتشاركون في كلّ الببتيدات الخاصّة بنسيج معين؛ وتشكل هذه الببتيدات مستضدات توافق نسيجي صغير عندما تقدّم من قِبَل جزيئات HLA مشتركة. إن مستضدات التوافق النسيجي الصغير هذه مهمّة من أجل مناعة GvH ومن أجل رفض الطعم من قِبَل الآخذ [67]. يمكن السيطرة على GvH متطابقة HLA وعلى مناعة GvH بشكل كبير بتطبيق معالجات عالية كابتة للمناعة التي تسبّب مخاطر الكبت المناعي المزمن [68، 69]. يفشل ثبات الطعم لدى المرضى الذين يعطون أعداداً محدودة من الخلايا المكونة للدم إذا ما تمّ التخلّص من الخلايا T، ويثبت الطعم لدى المرضى (يطورن مرض GvH) إذا ما احتُفظ بخلايا T المعطي لديهم [65]. يقال بأن الخلايا T هذه تسهّل عملية التطعيم [70–73]. يبعث وجود هذه الخلايا التي تسهّل عملية التطعيم على الأمل بإمكانية استعمالها في التطعيم إلى جانب الخلايا HSC لتسهيل عملية التطعيم بدون حدوث مرض GvH [70–73]. مع ذلك، وفي دراسات استُعملت فيها الفئران كنماذج للدراسة، فإن زيادة جرعة الخلايا HSC المزروعة كطعم كانت كافية لضمان عملية تطعيم مستديمة وسريعة بدون فشل لعملية التطعيم وانعدام مرض GvH حتى ولو كانت الفئران غير متطابقة تماماً من أجل H-2 [15، 74]. وبالنسبة للمرضى غير المصابين بالسرطان والذين يحتاجون إلى طعوم متخالفة مكوّنة للدم أو إلى طعوم HSC، يبدو أن طعوم HSC لوحدها وبجرعات مرتفعة ستكون أكثر فائدة. في الدراسات المجراة على الفئران، فإن جرعات HSC الكافية للحصول على تطعيم سريع في حالات التطعيم المتماثل هي أيضاً جرعات كافية للحصول على تطعيم بخلايا متخالفة في حالات عدم تطابق MHC [15].

يمكن، في حال تطابق HLA في الطعوم المتخالفة لاستعمالها في معالجة ابيضاض الدم، أن تقوم الخلايا T باستجابة من نوع طعم مقابل اللوكيميا Graft-versus-Leukemia GvL [75]. ومن بين مجموعة الخلايا GvL-T هنالك خلايا قادرة على التعرّف على بيتيدات خاصّة بالنسج في سياق HLA المشتركة [76]. وقد تمكّن الأطباء من التحكّم بهذه الاستجابة إلى حدٍّ يسمح بحقن لمفاويات المعطي (DLI) بعد التطعيم الأولي بالخلايا المكوّنة للدم، وعندما يتحسّن حال المريض أكثر وعندما يسيطر على استجابة GvH. هنالك عدد لا يستهان به من المرضى الذين يعانون من ابيضاض دم نقوي مزمن في مرحلة الشفاء التام أو المديد نتيجة لـ DLI [77، 78]. ومؤخراً، أُتبِعَ استعمال ازدراعات مصغّرة من خلايا MPB المتطابقة مع HLA، في مضيفين معالجين بجرعات شبه مميتة يتلقون عقاقير أكثر نوعية للمناعة التي تتوسطها الخلايا T، بـ DLI؛ وهذه العملية تُحدِث الموت والمرض المتصلين بالازدراع، مع المحافظة على فوائد GvL [79].

يمكن استعمال ازدراع الخلايا السلف أو الخلايا HSC المتخالفة في الأمراض غير الخبيثة لتعزيز قدرة المنظومة الدموية اللمفاوية عند العائل [80]. على سبيل المثال، عدد من الاضطرابات الأحادية التوريث monogenetic التي تؤدي إلى عوز في الخلايا ضمن الجهاز الدموي اللمفي بما في ذلك مجموعة واسعة من متلازمات نقص المناعة العام ومتلازمات الهيموغلوبين [65]. يمكن تحقيق إصلاح الأنزيمات الناقصة أو الغلوبينات الناقصة بازدراعات HSC متخالفة أو بازدراعات HSC ذاتية مصحّحة وراثياً. وقد تباطأ تطبيق التصحيحات الوراثية للخلايا الجذعية المكوّنة للدم وفقاً للمشكلات عند عدد من المراحل، ولكن كثيراً من هذه المشكلات تمّ حلّه [81].

استعمال الخلايا الجذعية المكوّنة للدم HSC المتخالفة في تحريض التحمل النوعي لازدراع مدى الحياة

من المعلوم منذ أواخر الخمسينيات أن طعوم نقي العظم المتخالفة المزدرعة في عوائل مشعّعة قد تؤدي إلى شيميرية chimerism منشؤها المتبرع، طيلة حياة المضيف العائل [82]. يملك هؤلاء العائلون منظومات دموية لمفاوية مشتقة بالكامل أو جزئياً من خلايا جذعية من المتبرع. ويكون هؤلاء العائلون عادة متحمّلين دائمين لازدراعات نسج أو أعضاء المتبرع. وبالتالي، يمكن ازدراع طعم HSC متخالف وطعم آخر، مثلاً قلب من المتبرع بخلايا HSC، والحصول على قبول نوعي مدى الحياة للازدراع مع الاحتفاظ بالقدرة على التفاعل مع طعوم ثالثة ومع العوامل الممرضة [80]. يفترض أن يكون ازدراع HSC وخلايا جذعية من أجل نسج وأعضاء أخرى من المتبرع نفسه ممكناً، كما ينبغي توفير ظرف يُهيأ فيه العائل بجرعات شبه مميتة تسمح بحدوث الشيميرية الدموية اللمفية

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

بهدف تحريض التحمُّل والتجدُّد النوعي للخلايا والأعضاء لاستبدال النظم المريضة والتالفة.

ازدراع الخلايا HSC المتخالفة لمعالجة أمراض المناعة الذاتية التي يحدّدها MHC

يكون للعديد من أمراض المناعة الذاتية أساس وراثي، وبخاصّة تلك المتعلّقة باستجابة الخلايا T تجاه المستضدات الخاصّة بالنسج أو الأعضاء مثل مرض السكري من النمط 1 (الجُزيرات المنتجة للأنسولين هي هدفها الرئيسي) [83]، والتصلّب المتعدّد multiple sclerosis (حيث تكون أغمدة العصب هي الهدف). وفي هذه الحالات، تكون أفضلية تطوير خلايا T المناعة الذاتية لتتناول أليلات MHC معيّنة [84]. وفي الفئران، أدّى ازدراع طعوم HSC من فئران طبيعية معطية في فئران سكرية محذوفة اللمفاويات lymphoablated diabetogenic (NOD) إلى إلغاء استجابة خلايا T المناعة الذاتية السكرية [80]. يكون العائلون متحملين لطعوم الجزيرات المزدرعة لاحقاً [85]. وبالتالي، يمكن أن تلغي ازدراعات HSC المتخالفة المناعة الذاتية وتحرّض التحمّل اللاحق للخلايا الجذعية والنسج أو طعوم الأعضاء.

ازدراع الخلايا الجذعية غير المكوّنة للدم

تقدِّم النماذج المذكورة آنفاً وسائل يمكن من خلالها تحريض التحمّل تجاه مجموعة من مستضدات المتبرع المزدرعة. في حالة المرضى المصابين بأمراض، يشكّل توليد خلايا ناضجة أو في طور النضج من عضو معيّن فيها مشكلة مركزية، ويمكن الازدراع المشترك لخلايا HSC مع خلايا جذعية غير دموية من تجدّد العضو.

سيمكّن التحديد الحديث لخلايا CNS-SC والقدرة على إنماء هذه الخلايا في الزجاج من تحديد العناصر العصبية والدبقية عند الضرورة [56]. لقد اختُبر حالياً ازدراع نسج تضم عصبونات منتجة للدوبامين مثل لب الكظر adrenal medulla، والناحية البطنية للدماغ المتوسط الجنيني، والورم العجائبي teratomas في نماذج حيوانية ومرضى يعانون من مرض باركنسون [45]. واستُعملت سلالات خلايا CNS القوارض التي تضم CNS-SC، والتي تُجعَل خالدة أحياناً بالمورثة v-myc [86] في عدد من نماذج الأمراض العصبية الوراثية التحللية عند الفئران [87]، بما في ذلك أمراض انعدام غمد النخاعين، وداء العقد العصبية الدماغية gangliosidosis، والاضطرابات العصبية التحللية [88]. ومن غير الواضح أي الخلايا هو المناسب للازدراع- الخلايا CNS-SC أم العصبونات المطلوبة، أم الخلايا السلف الوسطى بين النوعين. تلزم في المنظومة المكوّنة للدم فقط الخلايا HSC [11، 15]. ورغم أنه يمكن الاعتقاد بأن العصبونات الأكثر تمايزاً هي الطعوم الأنسب للازدراع في الجهاز العصبي، فإن التجدّد والتكوّن الطبيعيين للأجزاء المختلفة من الدماغ يحدثان عن طريق الخلايا الجذعية، ومن المعقول أن تكون الخلايا الجذعية والخلايا السلف هي القادرة على الهجرة والتمايز ومعالجة هذه العيوب العصبية. وبالتالي من المهم في الأمراض العصبية التحللية أولاً تحديد قواعد ازدراع الخلايا الجذعية والسلف والناضجة وتحديد المواقع التي يجب أن توضع فيها الازدراعات.

تضم الأمراض العصبية الأخرى المحتملة كهدف التصلّب المتعدّد، حيث يمكن إلغاء رد فعل الخلية T المسؤولة عن المرض بازدراعات HSC متخالفة أو تطبيق مناورات أخرى كابتة للمناعة [89]. وفي هذه الحالات، لا تُتضمّن عملية إعادة تشكيل غمد النخاعين العصبي من طلائع داخلية المنشأ، ويجب أن يكفل استعمال خلايا عصبية جذعية أو نسلها المحدود القدرات، والخلايا طلائع الدبق العصبي المكوّنة للنخاعين myelinating glia، أو الخلايا الدبقية، إعادة تشكيل غمد نخاعين نوعي للنسج وتجديد الوظيفة العصبية. الأهداف الأخرى المحتملة لازدراعات الخلايا العصبية وخلاياها السلف يمكن أن تشمل النسج المتخرّبة نتيجة الجلطات الصغيرة، وكذلك أذيات النخاع الشوكي،... إلخ.

ازدراع الخلايا الجذعية والسلف الأخرى

إن ازدراع الكبد هو المعالجة الأمثل في عدد من الحالات التي يتخرّب فيها الكبد بالسموم، أو العقاقير أو نتيجة للإصابة الفيروسية، أو أن تكون لدى المريض عيوب وراثية مسؤولة عن توليد العوامل أو المستقبلات التي ينتجها الكبد. وفي أغلب الأحيان تتطلّب الازدراعات الكبدية توفر متبرع متوفٍ حديثاً ولا يزال غضاً. وفي هذا الصدد، يذكر أن قائمة المرضى الذين ينتظرون إجراء زراعة كبد طويلة جداً. وطبعاً لأن المتبرعين الذين ماتوا حديثاً لا يتطابقون على الأغلب مع الآخذ من حيث جزيئات HLA، يكون هؤلاء المرضى متفاوتين من حيث تطابق HLA ويحتاجون إلى كبت مناعي قوي. من المعقول الافتراض أنه إذا كانت مجموعة الخلايا الجذعية أو الخلايا السلف للكبد والتي ستعيد استيطان الكبد متوفرة فسيكون إجراء زراعة أعضاء بين الأشقاء أمراً ممكناً.

يبدو أن تحديد مجموعات الخلايا الجذعية والسلف للجُزيرات في البنكرياس في بداياته المبكّرة [90]. ويُفضّل ازدراع خلية مكوّنة للجُزيرة على المعالجات اليومية بالأنسولين، لأن هذه الخلايا تتحسّس سويات الغلوكوز في الدوران وتستجيب بشكل مناسب بتحرير الأنسولين بالجرعة والوقت المضبوطين. ومعلوم بأن مضاعفات مرض السكري شائعة الحدوث وتقصّر العمر، ويصعب تدبيرها بالمعالجة بالأنسولين. وإن استعمال طعوم البنكرياس الكاملة صعب ويشبه عملية ازدراع الكبد. ويتطلّب ازدراع الجُزيرات توفير أعداد ضخمة من الخلايا الحيّة، كما يصعب حالياً إكثار خلايا الجُزيرات في الوسط الصنعي، وبالتالي يبدو معقولاً البحث عن الشروط التي تمكّن من توليد مستمر للجُزيرات ابتداءً من خلايا جذعية وسلف، كما في بعض النماذج على الفئران [90]، ومحاكاة ذلك في الجسم الحي.

وقد ينقذ تجدّد العضلات، في حالات أمراض ضمور العضلات الداخلية المنشأ، أو حالات فقدان عضلة، حياة إنسان. إن عزل الخلايا الجذعية العضلية التابعة من العضلات الهيكلية [46] أعطى الأمل بإمكانية استعمال الخلايا الجذعية في معالجة هذه الحالات. الهدف الثاني المحتمل لتجدّد العضلات هو القلب، حيث إن الموت السريع للخلايا بعد انسداد الشريان الإكليلي هو السبب الرئيسي للموت والمرض. ومن المؤسف أن الخلايا المكافئة للخلايا التابعة في النسيج القلبي لم تُحدَّد بعد.

من المتوقع أن تزداد عمليات الازدراع المشترك لخلايا HSC والخلايا الجذعية أو السلف للنسج أو الأعضاء خلال العقدين القادمين، وسيكون ذلك محصلة للتطورات المتشابكة في مجالي بيولوجيا الخلية الجذعية والمناعة المتصلة بازدراع النسج والخلايا الجذعية.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

REFERENCES المراجع

[1] T. Makinodan, Proc. Soc. Exp. Biol. 92, 174 (1956).

[2] C. Ford, J. Hamerton, D. Barnes, J. Loutit, Nature 177, 452 (1956)

[3] P; Nowell, L. Cole, J. Habermeyer, P. Roan, Cancer Res 16, 258 (1956).

[4] J; E. Till and E. A. McCulloch, Radiat. Res. 14, 1419 (1961).

[5] A. Becker, E. McCulloch, J; Till, Nature 197, 452 (1963).

[6] L. Siminovitch, E. McCulloch, J. Till, J. Cell. Comp. Physiol. 62, 327 (1963).

[7] C. A. Whitlock, G. F. Tidmarsh, C. Muller-Sieburg, I. L. Weissman, Cell 48, 1009 (1987).

[8] S. Ezine, I. L. Weissman, R. V. Rouse, Nature 309, 629 (1984).

[9] C. E. Muller-Sieburg C. A. Whitlock, I. L. Weissman, Cell 44, 653 (1986).

[10] G. J. Spangrude, S. Heimfeld, I. L. Weissman, Science 241, 58 (1988).

[11] N. Uchida and I. Weissman, J. Exp. Med. 175, 175 (1992).

[12] S. J. Morrison and I. L. Weissman, Immunity 1, 661 (1994).

[13] K. Ikuta and I. L. Weissman, Proc, Natl. Acad. Sci. U. S. A 89, 1502(1992).

[14] L. G. Smith, I. L. Weissman, S. Heimfeld, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 2788 (1991).

[15] N. Uchida et al., J. Clin. Invest. 101, 961 (1998).

[16] C. M. Baum, I. L, Weissman, A. S. Tsukamoto, A. M. Buckle, B. Peault, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 2804 (1992).

[17] A. Tsukamoto et al., in Hematopoietic Stem Cells: Biology and Therapeutic Applications, D. Levitt and R. Mertelsmann, Eds. (Dekker, New York, 1995), pp. 85-124.

[18] M. Osawa, K. Hanada, H. Hamada, H. Nakauchi, Science 273, 242 (1996).

[19] M. A. Goodell et al., Nature Med. 3, 1337 (1997).

[20] M. Bhatia, D. Bonnet, B; Murdoch, O. I. Gan, J. E. Dick, Nature Med. 4, 1038 (1998).

[21] S. Miraglia et al., Blood 90, 5013 (1997).

[22] R. S. Negrin et al., Biol. Blood Marrow Transplant., in press.

[23] M. Michallet et al., in preparation.

[24] J. Vose, in preparation.

[25] S. J. Morrison, A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright, I. L. Weissman, Development 124, 1929 (1997).

[26] I. L. Weissman, V. E. Papaioannou, R. L. Gardner, in Cold Spring Harbor Symposia on Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells, B. Clarkson, P. A. Marks, J. E. Till, Eds. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1978), pp. 33-47.

[27] A. Cumano, F. Dieterlen-Lievre, I. Godin, Cell 86, 907 (1996).

[28] A. Medvinsky and E. Dzierzak, Cell 86, 897 (1996).

[29] S. J. Morrison, H. D. Hemmati, A. M. Wandycz, I. L. Weissman, Proc. Natl, Acad. Sci. U. S. A. 92, 10302 (1995).

[30] S. H. Cheshier, S. J. Morrison, X. Liao, I. L. Weissman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 3120 (1999).

[31] G. B. Bradford, B. Williams, R. Rossi, I. Bertoncello, Exp. Hematol. 25, 445 (1997).

[32] S. J. Morrison, A. M. Wandycz K. Akashi, A. Gioberson, I. L. Weissman, Nature Med. 2, 1011 (1996).

[33] J. Domen and I. L. Weissman, Mol. Med. Today 5, 201 (1999).

[34] J. Domen, S. Cheshier, I. Weissman, j. Exp. Med. 191, 253 (2000).

[35] S. J. Morrison, D. E. Wright, I. L. Weissman, Proc. Natl, Acad. Sci. U. S. A. 94, 1908 (1997).

[36] A. Dasgupta, D. M. Willerford, S. L. McAfee, J. Infusional Chemother. 6, 12 (1996).

[37] M. Kondo, I. L. Weissman, K. Akashi, Cell 91, 661 (1997).

[38] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, Nature, in press.

[39] R. L. Cardner and J. Rossant, J. Embryol. Exp. Morphol. 52, 141 (1979).

[40] G. Keller and H. R. Snodgrass, Nature Med. 5, 151 (1999).

[41] S. J. Morrison, P. M. White, C. Zock, D. J. Anderson, Cell 96, 737 (1999).

[42] N. Uchida et al., in preparation.

[43] F. H. Gage, Curr. Opin. Neurobiol. 8, 671 (1998).

[44] T. D. Palmer, J. Takahashi, F. H. Gage, Mol. Cell. Neurosci. 8, 389 (1997).

[45] F. H. Gage, Science 287, 1433 (2000).

[46] E. Gussoni et al., Nature 401, 390 (1999).

[47] T. Asahara et al., Science 275, 964 (1997).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[48] F. M. Watt, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 353, 831 (1998).

[49] C. R. Bjornson, R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, A. L. Vescovi, Science 283, 534 (1999).

[50] K. A. Jackson, T. Mi, M. A. Goodell, in preparation.

[51] Q. Shi et al., Blood 92, 362 (1998).

[52] G. Ferrari et al., Science 279, 1528 (1998).

[53] M. A. Eglitis and E. Mezey, Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A. 94, 4080 (1997).

[54] B. E. Petersen et al., Science 284, 1168 (1999).

[55] M. K. Carpenter et al., Exp. Neurol. 158, 265 (1999).

[56] R. A. Fricker et al., J. Neurosci. 19, 5990 (1999).

[57] E. Thomas, H. Lochte, J. Cannon, O. Sahler, J. Ferrebee, J. Clin. Invest. 38, 1709 (1959).

[58] E. Thomas and R. Clift, in Hematopoietic Cell Transplantation, E. D. Thomas, K. G. Blume, S. J. Forman, Eds. (Blackwell Science, Malden, MA, 1999), pp. 807-816.

[59] W. A. Franklin et al., Blood 94, 340 (1999).

[60] Y. Gazitt et al., Blood 86, 381 (1995).

[61] B. J. Van den Eynde and T. Boon, Int. J. Clin. Lab. Res. 27, 81 (1997).

[62] C. Yee, P. Savage, P. Lee, M. Davis, P. Greenberg, J. Immunol. 162, 2227 (1999).

[63] D. M. Pardoll, Nature Med. 4, 525 (1998).

[64] A. van Elsas, A. Hurwitz, J. Allison, J. Exp. Med. 190, 355 (1999).

[65] R. O'Reilly, W. Friedrich, T. Small, in (58), pp. 1154-1172.

[66] E. W. Petersdorf, K. B. Shuler, G. M. Longton, T. Spies, J. A. Hansen, Immunogenetics 49, 605 (1999).

[67] E. Goulmy, Hum. Immunol. 54, 8 (1997).

[68] E. D. Thomas et al., N. Engl. J. Med. 292, 895 (1975).

[69] R. Storb et al., Blood 73, 1729 (1989).

[70] M. Sykes, M. Sheard, D. H. Sachs, J. Immunol. 141, 2282 (1988).

[71] K. L. Gandy, J. Domen, H. Aguila, I. L. Weissman, Immunity 11, 579 (1999).

[72] T. Lapidot, Y. Faktorowich, I. Lubin, Y. Reisner, Blood 80, 2406 (1992).

[73] C. L. Kaufman et al., Bbod 84, 2436 (1994).

[74] J. A. Shizuru, L. Gerabek, C. T. Edwards, I. L. Weissman, Biol Blood Marrow Transplant. 2, 3 (1996).

[75] Y. Z. Jiang et al., Bone Marrow Transplant. 19, 899 (1997).

[76] D. Bonnet, E. H. Warren, P. D. Greenberg, J. E. Dick, S. R. Riddell, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 8639 (1999).

[77] J. H. Falkenburg et al., Blood 94. 1201 (1999).

[78] H. Baurmann et al., Blood 92, 3582 (1998).

[79] P. A. McSweeney and R. Storb, Biol. Blood Marrow Transplant. 5, 192 (1999).

[80] J. Shizuru and I. Weissman, in (58), pp. 63-78.

[81] N. Uchida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 11939 (1998).

[82] I. Weissman, Adv. Biol, Med. Phys. 9, 160 (1963).

[83] J. A. Todd, J. I. Bell, H. O. McDevitt, Nature 329, 599 (1987).

[84] P. Conlon, J. R. Oksenberg, J. Zhang, L. Steinman, Neurobiol. Dis. 6, 149 (1999).

[85] J. Shizuru, in preparation.

[86] E. Y. Snyder, Curr. Opin. Neurobiol. 4, 742 (1994).

[87] L. L. Billinghurst, R. M. Taylor, E. Y. Snyder, Semin. Pediatr. Neurol. 5, 211 (1998).

[88] O. Brüstle et al., Science 285, 754 (1999).

[89] R. Martin, H. F. McFarland, D. E. McFarlin, Annu. Rev. Immunol, 10, 153 (1992).

[90] M. R. Kritzik et al., J. Endocrinol. 163, 523 (1999).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

تغيير المقدرة الكامنة باندماج تلقائي *

ك – ل. ينغ، ج. نيكولس ، و أ. ج. سميث
مركز أبحاث الجينوم – جامعة أدنبرة – المملكة المتحدة.
إ. ب. إيفانز
قسم علم الحيوان – جامعة أكسفورد – المملكة المتحدة.

ملخص

قدّمت تقارير حديثة اقتراحاً بأن الخلايا الجذعية للثديّات الكامنة في نسيج واحد قد يكون لها القدرة على إنتاج أنماط خلوية متمايزة لأنسجة وأعضاء أخرى [1 – 9]. وفي هذا المقال، قمنا بتعيين آلية يمكن بواسطتها لخلايا سَلَف من الجهاز العصبي المركزي أن تولّد مشتقات لا عصبية. وقد جرى استنبات مشترك لخلايا مأخوذة من دماغ الفأر مع خلايا جذعية جنينية متعددة المقدرة الكامنة. وعقب انتخاب واسم مُحوَّر وراثياً محمول بواسطة خلايا الدماغ فقط، عُزلت خلايا جذعية غير متمايزة خضع فيها مجين (جينوم) الخلية الدماغية إلى عملية إعادة برمجة فوق مجينية epigenetic reprogramming. لكن هذه الخلايا كانت أيضاً تحمل واسماً مُحوَّراً وراثياً وصبغيات مشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية؛ لذلك لا ينشأ النمط الظاهري المعدل بتحول مباشر للخلية الدماغية إلى خلية جذعية جنينية بل عبر تولد تلقائي لخلايا هجينة. وتبدي الهجن الرباعية الصيغة الصبغية صفة تعددية المقدرة الكامنة تماماً، متضمنة إسهاماً تعددي السلالة للشيميرات chimaeras. إننا نقترح بأن "تحديداً تحولياً transdetermination ناتجاً من اندماج خلوي [10] قد يشكل الأساس لعديد من الملاحظات التي كانت ستعزى بطريقة أخرى إلى تصنيعية ذاتية المنشأ خاصة بنسيج الخلايا الجذعية [9].

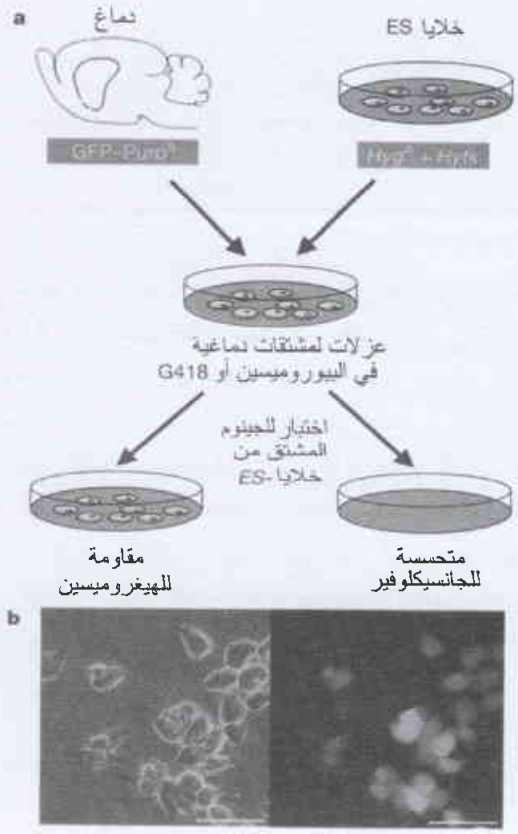
الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية جنينية، خلايا سلف، فئران مُحوَّرة وراثياً، هجن رباعية الصيغة الصبغية، خلايا دماغية، إعادة برمجة فوق مجينية، خيميرة، تحديد تحولي، تمايز تحولي، اندماج خلوي، تعددية المقدرة الكامنة.

كان من التقليدي اعتبار القدرة على توليد أنماط خلوية متمايزة ممثلة للطبقات المنشئة النهائية الثلاث سمةً محتفظاً بها لخلايا تابعة للكتلة الخلوية الداخلية وللأرومة العلوية epiblast في الجنين المبكر وما يشتق عنه، في الزجاج، من السرطنة الجنينية embryonal carcinoma وخلايا جذعية جنينية (ES cells) [11، 12]. لكنه، تمّ في الآونة الأخيرة عزو فعاليات غير عادية إلى خلايا جذعية معزولة من مختلف أنسجة جنينية وبالغة متنوعة بما في ذلك الجهاز العصبي المركزي (CNS). وسبق أن أخبر الباحثون عن أن خلايا جذعية من الجهاز العصبي المركزي – عندما تحقن داخل فئران مشعَّعة [6] – تساعد سلالات خلوية مكونة للدم haematopoietic lineages على إنتاج العضل عندما تُستنبت مع أورمات هيكلية [13]، كما تستوطن سلالات جنينية متعددة عندما يجري إيلاجها إلى داخل أجنة ما قبل الغرس pre - implantation embryos [5]. وظرف آخر يبدو فيه أن الخلايا الجذعية للجهاز العصبي تغير تحديدها عندما تستزرع برفقة خلايا جذعية جنينية Es قيد التمايز، أي عندما تشكّل أنابيب عضلية متعددة النوى [5]. وقد قمنا بدراسة الأساس الذي ترتكز عليه الظواهر المذكورة آنفاً، وبخاصة فيما إذا كان من الممكن لخلايا الجهاز العصبي المركزي أثناء فترة الاستنبات المشترك أن تتحول أولاً إلى خلايا جنينية متعددة المقدرة وذلك كمسار لتوليد أنماط خلوية أخرى.

واستخدمنا واسمات محددة محورة وراثياً بهدف عزل وتعيين ذرية الخلايا الجذعية وخلايا الجهاز العصبي المركزي (الشكل 1). وبحكم تكوينها، شاركت فئران ZIN40 بإظهار مقاومة لعامل الانتخاب G418 ولنشاط أنزيم بيتا – غلاكتوسيدز النووي nuclear β - galactoidase [14]. أما فئران Oct4-Gip فتظهر مقاومة للبيوروميسين puromycin ولبروتين أخضر مفلور green fluorescent protein (GFP) حصرياً بالخلايا المتعددة المقدرة وخلايا السلالة المنشئة التي تخضع لتوجيه متتاليات مُنظِّمة خاصة بمورثة Oct4 الفأرية [15]. وقد تمّ تحضير مستنبتات لكريات عصبية neurosphere من أدمغة أمامية متفككة لأجنة مُحوّرة وراثياً، في اليوم 14.5 من عمرها الجنيني، تحمل أيّاً من الواسمين المذكورين آنفاً. نُشرت الكرات العصبية لمدة ثلاثة أيام ثم جُمعت مع خلايا HT2 ES. هذا، وتحمل خلايا HT2 مورثة الاندماج (Hytk) [16] الخاصة بكيناز تيميدين hygromycin phosphotransferase - herpes simplex virus (HSV) والتي تمّ إيلاجها إلى داخل موضع Oct4 بواسطة

* نُشر هذا المقال في مجلة *Nature*, Vol.416, 4 April 2002. ترجمة هيئة التحرير – هيئة الطاقة الذرية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



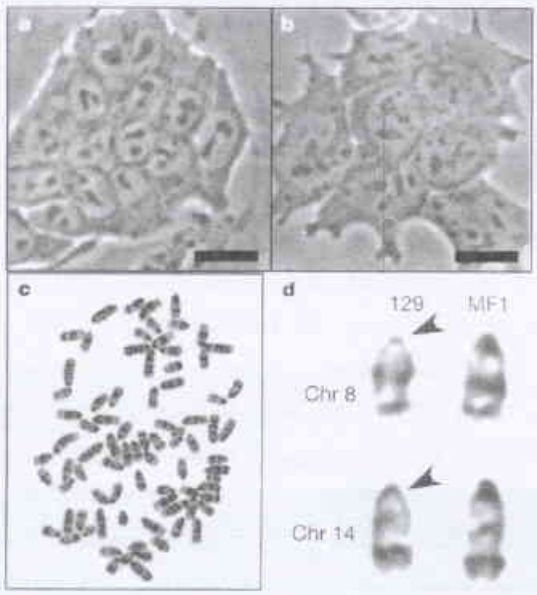
الشكل 1- عزل وتعيين ذرّية الخلايا الجذعية الجنينية والخلايا الخاصة بالجهاز العصبي المركزي. (a) رسم تخطيطي للاستراتيجية التجريبية. (b) التعبير عن GFP (بروتين أخضر مفلور) في خلايا غير متمايزة جرى عزلها بعد استنبات مختلط لخلايا الدماغ الجنينية Oct4 - GiP مع خلايا HT2 ES وانتخاب في البيوروميسين.

عملية تأشيب متماثل homologous recombination [17، 18]. تلا ذلك تطبيق انتخاب باستخدام إما العامل G418 أو البيوروميسين حسبما يكون مناسباً للتخلص من خلايا HT2. وبعد فترة تراوحت ما بين 2 - 4 أسابيع انبثقت من جديد كخلايا تكاثرية بمواصفات شكل الخلايا الجذعية الجنينية اللامتمايزية (الشكل 2b). وقد حصل على مستعمرات جديدة من كل واحد من المستنبتات الثلاثة والعشرين المشتركة. وشملت المستنبتات المذكورة تجربة تمّ فيها جمع خلايا جنينية من الدماغ النهائي fetal telencephalic cells بشكل مباشر مع خلايا جذعية جنينية دون تحضير مسبق للكريات العصبية. وعلى نحو ملائم، عبّرت الخلايا التي تحملت الانتخاب عن نشاط إما لأنزيم بيتا - غلاكتوسيداز النووي (خلايا ZIN40) أو للبروتين الأخضر المفلور (GFP) السيتوبلازمي (خلايا Oct4 - GiP). وتكون تعبيرية المورثة المحورة Oct4 - GiP (الشكل 1b) ملفتة للنظر، لأنه - كما في المُورثة Oct4 ذاتها - لا تحصل تعبيرية لهذه المورثة المحورة إلّا في خلايا السلالة المنشئة والخلايا المتعددة المقدرة بينما تكون غير نشطة في خلايا الجهاز العصبي المركزي سواء في الحي أو في المستنبت الأولي ([15] إضافة إلى ملاحظات لنا لم تنشر بعد). لذلك، يكون نشاط GFP دالاً كحد أدنى على إعادة برمجة جزئية فوق مجينية لابنيوية لمجين الخلية الجسمية وتحوله إلى حالة تعددية المقدرة الكامنة pluripotency. وهكذا يبدو أنه بالإمكان توليد الخلايا الجذعية الجنينية (ES cells) من خلايا الدماغ الجنيني.

بعد ذلك، قمنا باختبار تعبيرية الخلايا المذكورة آنفاً عن واسم المقاومة للهيغروميسين الذي تحمله خلايا HT2 - ES فقط (الشكل 1a). وكانت المستنبتات مقاومة تماماً للهيغروميسين؛ كما كانت، إضافة إلى ذلك، حساسة للجانسيكلوفير gancyclovir الذي لا يقتل سوى الخلايا التي تأوي المورثة المحورة HSV TK. ولاستبعاد الاحتمال الذي يفيد بأن انتخاباً غير فعال قد يسبب نشوء مستنبتات مختلطة، قمنا بتوليد عدة مشتقات نسيلية عن طريق تحديد التمديد. وقد أظهرت جميع العزلات النسيلية أنماطاً ظاهرية لخلية جنينية وجذعية جنينية مقاومة أو حساسة.

وبذلك، فإن تعبيراً مشتركاً لواسمات انتخاب مُحوّرة مورثياً ذات أصل مغاير يحصل في خلايا مفردة.

كنّا نُخمّن أن الخلايا المنتخبة كانت هجينةً؛ وبما يتفق مع هذا الاحتمال، كانت لهذه الخلايا نوى ضخمة تحتوي على نويات متعددة (الشكل 2a, b). ولاختبار هذا التفسير بشكل مباشر، قمنا بتحضير انتشارات صبغية في الطور التالي من الانقسام (الشكل 2c). وفي جميع الحالات أظهر التحليل لثماني عشرة عزلة مستقلة وجود مجموعة صبغية إما رباعية الصيغة أو أقرب من رباعية الصيغة. وكانت الخلايا الجذعية الجنينية ES ذكرية المنشأ؛ وفي حال استخدام جنين مؤنث كمصدر



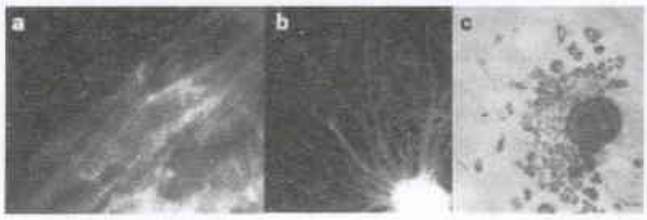
الشكل 2- الشكل الظاهري والبنية الصبغية. (b, a) صورتان مجهريتان لخلايا جذعية جنينية أبوية (a) ولخلايا عزلت بعد استنبات مختلط (b) تُبيّنان نوى متضخمة ذات نويات متعددة في خلايا كانت، من ناحية أخرى، تتمتع بمورفولوجية نموذجية خاصة بالخلايا الجذعية الجنينية ES (شريط السلّم = 25 µM). (c) انتشار الطور التالي من الانقسام metaphase spread يُري مجموعة صبغية رباعية الصيغة بعد استنبات مختلط لكريات دماغية لحيوان بالغ مع خلايا جذعية جنينية ES. (d) صبغيات الأرومة 129 واللاأرومة 129 في خلايا مشتقة من استنبات مختلط. يشير رأسا السهم إلى عصابات C للقسيم المركزي ذات الأشكال المتعددة والتي تكون مختزلة في صبغيات الأرومة 129، وضخمة في صبغيات MF1 أو C57BL/6 الخاصة بالفئران المحورة وراثياً.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

للخلايا الدماغية كانت المجموعة الصبغة الجنسية XXXY. ويمكن بسهولة تمييز الأصل الأرومي للصبغين 8 و14 وذلك بسبب ظواهر التعددية الشكلية polymorphisms في الكروماتين المتغاير مركزي القسيم المركزي (الصبغين) centromeric heterochromatin [19]. وقد كان كل من الأصلين: الأرومي بصبغياته الـ 129 والفأري اللاأرومي المحور جينياً بصبغياته الـ 129 موجودين في ثلاث عزلات منفصلة تمّ اختبارها بهذه الطريقة (الشكل 2d). ولا يمكن تفسير الملاحظات المذكورة آنفاً إلّا من خلال تشكل هجن خلوية ما بين خلايا الجهاز العصبي المركزي والخلايا الجذعية الجنينية ES.

وعبّرت الخلايا الهجينة عن واسمي الخلية الجذعية الجنينية؛ أنزيم الفسفاتاز القلوية والمستضد الجنيني النوعي الطور stage- specific embryonic antigen (SSEA)-1 (بيانات غير معروضة). بعبارة أخرى، عبّرت هذه الخلايا الهجينة عن عامل الاستنساخ الخلوي الأساسي Oct-4 [18، 20] الخاص بالخلايا متعددة المقدرة الكامنة، كما عبّرت في الوقت ذاته عن المورثة المحورة وراثياً Oct4 - GiP؛ وهي، مثل الخلايا الجذعية الجنينية ES الطبيعية، كانت معتمدة على عامل التجدد الذاتي المعروف باسم "العامل التثبيطي لابيضاض الدم leukaemia inhibitory factor (LIF)" والكابح لعملية التمايز [12]. وعند تكدس الخلايا المذكورة آنفاً فإنها تشكل أجساماً شبه جنينية مضغية embryoid bodies [21] تحتوي على كل من الأدمة الباطنة خارج الجنينية، والخلايا العضلية القلبية ذاتية التقلص (الشكل 3). وقد تبين أن الأجسام شبه الجنينية المعالجة بحامض الريتينويك retinoic acid تنشىء خلايا عصبية. وهكذا نجد أن الهجن تتمتع بتجدد ذاتي وخواص تمايز في الزجاج شبيهة بتلك التي تعزى إلى الخلايا الجذعية الجنينية ES الاعتيادية [12]. وبوجه مماثل، تبين أن الهجن المنتجة بواسطة اندماج كهربائي لخلايا جذعية جنينية ES مع خلايا توتية (غدة التوتة) thmocytes تُظهر خصائص الخلية الجذعية الجنينية ES [23].

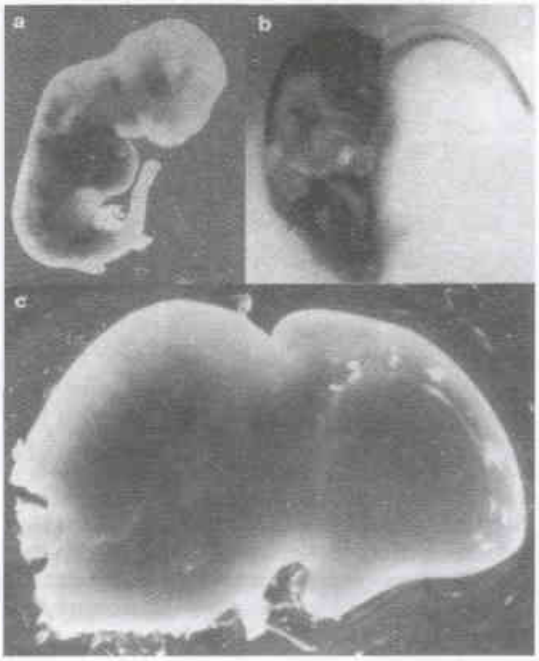
وعن طريق الحقن ضمن الكيس الأرومي blastocyst injection، درسنا القدرة الخاصة على الاندماج في تنام جنيني. وقد تمّ كشف درجة الإسهام في تشكيل أنسجة جنينية في ثمانية من أصل 23 جنيناً عن طريق استخدام تلوين بيتا - غلاكتوسيداز للواسم ZIN40 (الشكل 4a). وكانت الإسهامات متواضعة مقارنة بإسهامات الخلايا الجذعية الجنينية ES المعيارية، كما كانت متفاوتة بين الأنسجة؛ لكن ذلك كان متوقعاً نتيجة



الشكل 3- تعددية المقدرة الكامنة pluripotency لخلايا هجينة. حُضّرت أجسام شبه جنينية من خلايا هجينة ثم حُلّلت بواسطة تلوين مناعي لواسمات خاصة إما بالخلايا العضلية القلبية (a, β-actinin)، أو بالعصبونات في حال معالجتها بحامض الريتينويك (b, type III tubulin)، أو بواسطة تهجين في الموضع (c)؛ والتي أظهرت mRNA من النمط Sparc داخل خلايا مهاجرة لها مورفولوجية الأدمة الباطنة الجدارية النموذجية.

نمو مفرط تنافسي لخلايا هجينة رباعية الصيغة الصبغية بوساطة خلايا مضيفة ثنائية الصيغة الصبغية [24]. وكان من الممتع أن أظهر فأر واحد، من بين الفئران الأربعة عشر التي ولدت حية، الشيميرية الصريحة لكساء ملون (الشكل 4b)؛ وتمّت التضحية بهذا الحيوان وحلّلنا أعضاءه الداخلية من أجل كشف التعبير عن أنزيم بيتا - غلاكتوسيداز النووي. وقد تمّ كشف التلوين في كل من المعي والكلية والقلب، ومعظم التلوين تمّ كشفه في الكبد (الشكل 4c). ونظراً لوجود نسبة من الخلايا الكبدية الرباعية الصيغة الصبغية بشكل طبيعي في الكبد، فإن ذلك يفسر الإسهام الدائم للخلايا الهجينة في هذا العضو. وتُرشّح الملاحظات المذكورة آنفاً الفكرة بأن وجود مجين مشتق من خلية دماغية لا يُعدّ مانعاً لإسهام تعددي السلالة بالنسبة لهجن الخلايا الجذعية الجنينية ES.

وفي نهاية المطاف، درسنا فيما إذا كان من الممكن حدوث وقائع مماثلة للاندماج في خلايا معزولة من دماغ حيوان بالغ؛ ومن أجل ذلك تبنينا برنامجاً معدلاً للاستنبات والانتخاب يسمح نسبياً بمعدل تكاثر أبطأ للكريات العصبية المشتقة من حيوان بالغ. فحُضّرت كريات عصبية من فئران محورة وراثياً تعبر تعبيراً شمولياً عن بروتين الاندماج tau GFP المرتبط بمقاومة للبيوروميسين [25]. وجرى تشريح البطينين الجانبيين الدماغيين لأنثى فأر عمرها ثمانية أسابيع، ثم جرى إكثار للكريات العصبية لمدة أسبوعين كما سبق وصفه [5]. بعد ذلك، تمّ جمع خلايا الكريات العصبية هذه مع خلايا جذعية جنينية ES بنسبة 1: 10 ضمن مستنبت متماسك. وقد أبقي على المستنبت المختلط لمدة أسبوع داخل بيئة الخلية العصبية الجذعية المدعمة بالعامل LTF (العامل التثبيطي لابيضاض الدم). بعد ذلك، نُقل المستنبت إلى بيئة خلية جذعية جنينية ES، ثم جرى نشره



الشكل 4- إسهام الخلايا الهجينة ZIN40 HT2 في تشكيل الشيميرات. (a) تلوين أنزيم بيتا - غلاكتوسيداز لشيميرية جنينية معاقة قليلاً بعمر جنيني قدره 11.5 يوماً. (b) شيميرية لفأر بالغ. (C) تلوين بأنزيم بيتا - غلاكتوسيداز لكبد مأخوذ من شيميرية فأر بالغ.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

لمدة أسبوع آخر قبل تطبيق انتخاب للبيوروميسين. بعد أسبوعين من الانتخاب، ظهرت مستعمرات تكاثرية لخلايا جذعية جنينية ES معبرة عن tau GFP؛ وكانت لهذه الخلايا نوى ضخمة تحوي نويات متعددة. وأكدت مستحضرات صبغية بأن الخلايا الأخيرة كانت رباعية الصيغة الصبغية مع مجموعة من النمط XXXY (الشكل 2c) وبأنها محتوية على الصبغيين 8 و14 المعبرين عن الأرومة 129 واللاأرومة 129 كليهما.

في هذه التجارب، يُراوح تواتر عزل الهجين ما بين 10^{-4} و10^{-5} لكل خلية دماغية مستنبتة وذلك رغم عدم بذل جهود للأمثلة. وتحت ظروف الاستنبات في تجاربنا لم يكن أي نوع من مولِّدات الدمج fusogen موجوداً، الأمر الذي يشير إلى أن الهجن تولدت بواسطة اندماج تلقائي بين الخلايا الجذعية الجنينية (ES cells) والخلايا الخاصة بالجملة العصبية المركزية (CNS cells). ولا تعتمد الظاهرة السابقة على استخدام خلايا HT2 لأن سلالة من الخلايا الجذعية الجنينية ES مشتقة على حدة، وهي 46C، كات قد استخدمت في الاندماج مع خلايا الكريات العصبية لحيوان بالغ. كذلك، سبق لنا أن حصلنا من مستنبتات مشتركة co - cultures على هجن بين خلايا ES. وجرى أصلاً توثيق حدوث اندماج تلقائي بين الخلايا الثديية في عام 1961 [26، 27]؛ وقدّم هذا التوثيق الأساس لتطوير علم وراثة الخلايا الجسمية، كما وفّر الإدراك والقبول بإمكانية إعادة برمجة التخصيص الخلوي cell specification في الهجن [10]. وتمّت معاينة العمل المذكور آنفاً في تقارير حديثة حول التحديد التحولي transdetermination والتمايز التحولي transdifferentiation [1-8، 13]، الأمر الذي نجم عنه تحدٍّ مهم لمفهوم "التقييد السلالي التدريجي progressive lineage restriction" أثناء عملية التنامي [9]. من جهة ثانية، وكما قمنا بتبيانه هنا، تُقدِّم حقيقة أن الخلايا الثديية قادرة تلقائياً على تشكيل هجن تفسيراً بديلاً للقدرة الظاهرية لخلايا مأخوذة من نسيج ما على توليد نسيلة لنوع آخر من الأنسجة. لذلك، كان من واجب ادعاءات مستقبلية بشأن التصنيعية الخلوية cell plasticity أن تختبر الوجود، ليس لواسمات خلية المانح فقط، بل لواسمات خلية المضيف أيضاً في أي نتاج مفترض لعملية تحديد تحولي.

الطرائق

حُفظت خلايا جذعية جنينية وخلايا هجينة ضمن بيئة مدعمة بالعامل LIF دون استخدام مغذيات [28]. كانت الخلايا الجذعية الجنينية ES لـ: HT2 و46C ناجمة عن استيلاد داخلي نقي للأصل 1290 la. وكانت الفئران المحورة وراثياً ناجمة عن خلفيات خليطة بين: 129 × MF1(ZIN40 and Oct4 - GiP) و$129 \times$ C57BL/6 (tau GFP). وقد تم تحضير مستنبتات الكريات العصبية، ثم تمّ نشرها في بيئة DMEM/F12 مدعمة بـ: N2 وB27 إضافة إلى عامل الأرومة الليفية 10) -2 ($ng\ ml^{-1}$) [5]. وجرى مزج الكريات العصبية الجنينية مع خلايا ES بنسبة 1: 2 ثم استنبتت فوق أطباق جرى تغليفها بمركّبي بولي دي ليزين ولامينين بمعدل للخلايا قدره: $1\text{-}1.5 \times 10^{4} cm^{-2}$. جرى حفظ المستنبتات ضمن بيئة الخلية الجذعية العصبية لمدة 48 ساعة ثم جرى تبديلها ببيئة الخلية الجذعية الجنينية ES المحتوية على مصل (سيروم) جنين العجل إضافة إلى LIF. تمّت إضافة G418 ($200 - 400\ ug\ ml^{-1}$) G418 بعد انقضاء يومين إضافيين على الاستنبات المختلط؛ لكن إضافة البيوروميسين ($1\mu g\ ml^{-1}$) تمّت بعد 6 أيام فقط لأنه لم يجر التعبير عن المورثة المحورة Oct4- GiP في خلايا الدماغ. أما في حالة الكريات العصبية المأخوذة من الحيوان البالغ، فقد تمّ تحضير المستنبت المختلط بنسبة 1: 10 لكل من الخلايا الدماغية والجذعية الجنينية ES على التوالي، والتي حفظت لمدة أسبوعين قبل تطبيق عملية انتخاب للبيوروميسين. أما بالنسبة لتمايز خلايا ES وإنتاج الشيميرية فقد اتبعت فيهما البروتوكولات القياسية [29].

المراجع

REFERENCES

[1] Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. & Blau, H. M. from marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice, Science 290, 1775- 1779 (2000).

[2] Mezey, E., Chandross. K. J., Harta, G., Maki. R. A. & McKercher. S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo, from bone marrow. Science 290, 1779- 1782 (2000).

[3] Krause, D. S. et al. Multi-organ, multi - lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 105, 369-377 (2001).

[4] Lagasse, E. et al Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocyles in vivo. Nature Med. 6, 1229 - 1234 (2000).

[5] Clarke, D. L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 288, 1660 - 1663 (2000).

[6] Bjornson, C. R., Rietze. R. L., Reynolds, & B. Magli, M. C. & Vescovi, A. L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo, Science 283, 534-537 (1999).

[7] Ferrari, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279, 1528- 1530 (1998).

[8] Orlic, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410. 701 - 705 (2001).

[9] Blau, H. M., Brazelton, T. R. & Weimann, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell 105. 829-841 (2001).

[10] Ephrussi, B. Hybridization of Somatic Cells (Princeton Univ. Press. Princeton, 1972).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[11] Gardner, R. L. & Beddington, R. S. Multi-lineage "stem" cells in the mammalian embryo. J. Cell Sci 10 (Suppl.), 11 - 27 (1988).

[12] Smith, A. in Stem Cell Biology (ed. Marshak, D. R. Gardner, R. L. Cottlieb, D.) 205-230 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).

[13] Calli, R. et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. Nature Neurosci. 3, 986-991 (2000).

[14] Mountford, P. & Smith. A. G. Internal ribosome entry sntes and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. Trends Genet. 11, 179- 184 (1995).

[15] Yeom, Y. I. et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totpotent cycle of embryonal cells. Development 122. 881 -894 (1996).

[16] Lupton, S. D., Brunton, L. L., Kalberg, V. A. & Overell, R. W. Dominant positive and negative selection using a hygromycin phosphotransferase - thymidine kinase fusion gene. Mol Cell. Biol. 11, 3374 - 3378 (1991).

[17] Mountford, P. et al. Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 4303-4307 (1994).

[18] Niwa. H., Miyazaki. J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation. dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature Genet. 24. 372-376 (2000).

[19] Akeson, E. C. & Davisson, M. T. in Genetic Variants and Strains of the Laboratory. Mouse (eds Lyon, M., Rastan, S. & Brown, S.) 1506- 1509 (Oxford Univ. Press, Oxford. 1996).

[20] Nichols, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct- 4. Cell, 95, 379 -391 (1998).

[21] Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz. M., Schmindt, W. & Kemler, R. the in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral Yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Exp. Morphol 87, 27 - 45 (1985).

[22] Bain. G., Kitchens, D., Yao. M., Huettner. J. E. & Gottlieb, D. I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev. Biol. 168. 342-357 (1995).

[23] Tada, M., Takahama. Y., Abe, K., Nakatsuji. N. & Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, Curr. Biol. 11, 1553- 1558 (2001).

[24] Nagy, A. et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development 110, 815 - 821 (1991).

[25] Pratt. T., Sharp, L., Nichols, J., Price, D. J. & Mason, J. O. Embryonic stem cells and transgenic mice ubiquitously expressing a tau-tagged green fluorescent protein. Dev. Biol. 228. 19-28 (2000).

[26] Barski, G., Sorieul. S.& Cornefert, F. "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. J. Natl Cancer Inst. 26. 1269- 1291 (1961)

[27] Sorieul, S. & Ephrussi, B. Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro. Nature 190, 653 - 654 (1961).■

سلالات خلوية جذعية جنينية من أكياس أرومية بشرية: تمايز جسمي في الزجاج*

ب. ي. روينوف وآخرون
معهد موناش - جامعة موناش - ملبورن - أستراليا

ملخص

نشرح هنا اشتقاق خلايا جذعية جنينية (ES) متعددة المقدرة الكامنة من أكياس أرومية بشرية. استنبتت سلالتان خلويتان جذعيتان جنينيتان ES ثنائيتا المجموعة الصبغية في الزجاج لفترات طويلة. حافظت الخلايا خلال ذلك على تعبيريتها عن واسمات مميزة لخلايا الرئيسات متعددة المقدرة الكامنة. تركب الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية عامل الانتساخ Oct-4، الضروري من أجل تطور الخلايا متعددة المقدرة الكامنة عند الفأر. وعند ازدراعها في الفأر SCID، تعطي السلالتان ورماً مَسِخاً teratomas يحتوي على مشتقات من جميع الوريقات (الأدمات) الجنينية المولدة الثلاث. تتمايز كلتا السلالتين الخلويتين في الزجاج إلى سلالات خلوية جسمية وخارج جنينية. ويمكن عزل خلايا مولدة عصبية من مستنبتات الخلايا الجذعية الجنينية ES المتمايزة التي تحرض على تشكيل عصبونات ناضجة. تزودنا الخلايا الجذعية الجنينية بأنموذج لدراسة التكون الجنيني البشري المبكر، ويعتبر هذا النموذج أداة بحثية لاكتشاف عوامل نمو جديدة وعقاقير، وأيضاً مصدراً فعّالاً للخلايا لاستخدامها في علاجات الازدراع.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية جنينية، خلايا سرطانية جنينية، معالجة بالازدراع.

مقدمة

تملك الخلايا متعددة المقدرة الكامنة pluripotential في الجنين المقدرة على توليد ذرية متمايزة من جميع الطبقات الجنينية المُنْشِئة الثلاث، إضافة إلى النسج الخارج جنينية التي تدعم عملية التطور الجنيني. وعند الثدييات، تنحصر صفة المقدرة الكامنة المتعددة في الخلية البيضية oocyte وفي البيضة الملقحة zygote، وفي الخلايا الجنينية الأولى، وفي الخلايا الابتدائية المنشِئة، وفي الخلايا الجذعية للأورام المشتقة من خلايا متعددة المقدرة الكامنة (الكارسينومات الجنينية). وفي بعض الظروف، يمكن أن تتكاثر خلايا جذعية متعددة المقدرة الكامنة لما لا نهاية في الزجاج ولا تزال تحافظ على مقدرتها على التمايز إلى طيف واسع متنوع من النسج الجسمية والخارج جنينية. وقد قاد عمل رائد على خلايا كارسينوما جنينية (EC) فأرية إلى اشتقاق خلايا جذعية جنينية (ES) ثنائية المجموعة الصبغية diploid متعددة المقدرة الكامنة مباشرة من كيس أرومي للفأر عام 1981 [1، 2]. ومنذ الوصف الأول لخلايا جذعية جنينية ES فأرية، أُقِرَّ بأن اشتقاق خلايا جذعية جنينية ES بشرية يمكن أن يؤدي إلى مصدر فريد من أجل التحليل الوظيفي للتطور الجنيني البشري المبكر. فعلى سبيل المثال، يمكن استخدام خلايا جذعية جنينية ES بشرية لتمييز عوامل عديدة يبتيد متورطة في تمايز وتكاثر خلايا سلالات جنينية محددة. وعلاة على ذلك، ولأن الخلايا الجذعية الجنينية ES تستطيع مبدئياً أن تخدم كمصدر غير محدود لأي نمط خلوي في الجسم، يمكن لخلايا جذعية جنينية ES بشرية أن تعطي في الزجاج نماذج عالية الفعالية للاستخدام في برامج الاستقصاء الدوائي، والتزويد بمصدر خلوي للتجديد للاستخدام في المعالجة بالازدراع.

لقد استُخدمت فيما مضى سلالات خلوية مستنبتة مشتقة من سرطانات جنينية كنماذج من أجل التمايز الخلوي في المراحل المبكرة من التطور الجنيني البشري (مثال، انظر المراجع [3-5]). تشبه الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية متعددة المقدرة الكامنة، والقادرة على التمايز العفوي إلى الطبقات المولدة الثلاث جميعها، الخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية في اعتمادها على طبقة خلوية مغذية من أجل النمو المستمر، وفي تعبيرها عن عامل الانتساخ Oct-4 [4، 6]. بيد أن الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية تختلف عن الخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية في أشكالها، وفي تعبيريتها عن واسمات خلوية سطحية، وفي غياب استجابتها لعامل التثبيط اللوكيمي (LIF). لقد ذكر تومسون وزملاؤه حديثاً تمكنهم من عزل وتمييز خلايا جذعية جنينية ES مضاعفة المجموعة الصبغية من قردة الريزوس rhesus والقريد الأمريكي marmoset ذات المقدرة الواسعة على التمايز [7، 8]. تشبه هذه الخلايا الجذعية الجنينية ES القردية الخلايا الجذعية السرطانية EC البشرية في شكلها، وفي تعبيرية واسماتها، وفي غياب الاستجابة لـ LIF.

لقد وصفنا سابقاً مميزات المستنبتات الخلوية الأولية للخلايا غير المتمايزة المأخوذة من أكياس أرومية جنينية بشرية التي كانت قادرة على القيام بتضاعف محدود في الزجاج [9]. وبما أن هذه الدراسات المبكرة لم تستخدم دعامة خلوية مغذية جنينية (المطلوبة من أجل تكاثر الخلايا

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Nature Biotechnology*, April 2000. ترجمة الدكتور أحمد عثمان - هيئة الطاقة الذرية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

السرطانية الجنينية EC البشرية متعددة المقدرة الكامنة وخلايا جذعية جنينية ES لابشرية من الرئيسات primates) واعتمدت بدلاً من ذلك على تزويد وسط الاستنبات بـ LIF، فقد طرأ على هذه الخلايا بالواقع تمايز خلوي أو موت خلوي. ولهذا، فقد استخدمنا بالتالي نظام استنبات خلوي متضمناً طبقة خلوية مغذية من الخلايا الأرومية الليفية fibroblast الجنينية من أجل اشتقاق خلايا جذعية جنينية ES من الأكياس الأرومية. وفي الوقت الذي كان فيه التقدم جارياً في هذا العمل، نشر تومسون وزملاؤه [10] تقريراً يذكرون فيه اشتقاق سلالات خلوية جذعية جنينية ES من أكياس أرومية بشرية. إننا نؤكد هذه النتائج ونتوسع في توصيف النمط الشكلي للخلية الجذعية الجنينية ES البشرية. ونوضح أكثر من ذلك أن الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية تعبر عن عامل الانتساخ Oct-4 وتعاني من تمايز خلوي جسمي في الزجاج، ونصف عزل خلايا سلف مولدة عصبية neural progenitor من مستنبتات خلوية جذعية جنينية ES.

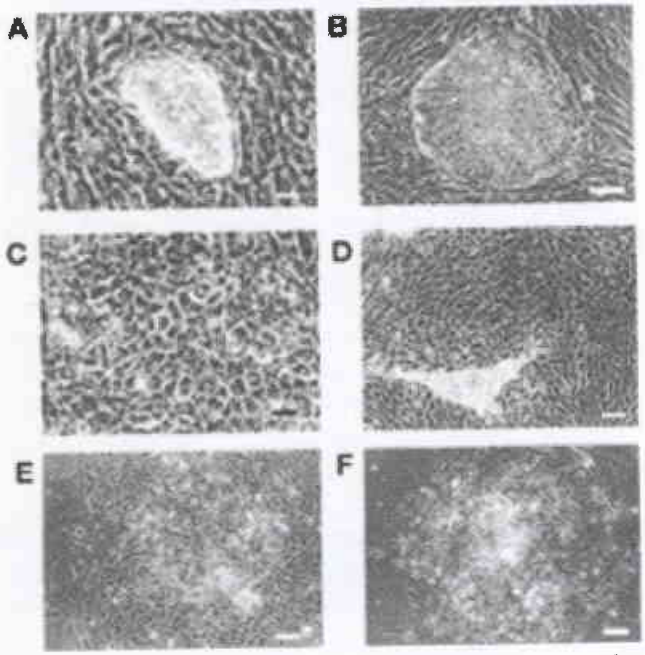
النتائج

اشتقاق السلالة الخلوية HES-1 و HES-2

نزعت طبقة الوريقة الخارجية المغذية trophectoderm من أربعة أكياس أرومية بطريقة الجراحة المناعية لعزل الكتلة الخلوية الداخلية (ICM)، ثم سطحت فوق طبقة مغذية من خلايا أرومية ليفية جنينية فأرية (الشكل 1A). وخلال بضعة أيام، بدأت مجموعات من الخلايا الصغيرة المتماسكة بالتكاثر من كتلتين خلويتين داخليتين ICM من أصل الأربع ثم فصلت الخلايا الصغيرة من تبرعمات نامية للخارج من الخلايا المتمايزة بصورة آلية، وأعطت هذه بعد إعادة تسطيحها على طبقة مغذية مستعمرات خلوية منبسطة ذات مظهر شكلي يشبه مظهر الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية أو مظهر الخلايا الجذعية الجنينية ES للرئيسات (الشكل 1B، C). كوثرت هذه المستعمرات لأكثر من ذلك بواسطة الفصل الميكانيكي إلى مجموعات وتجمعات أصغر، حيث أعيد تسطيحها على طبقات خلوية مغذية جديدة. ولم يكن النمو بدءاً من تجمعات خلوية صغيرة (< 10 خلايا) ممكناً في ظروف هذه المستنبتات الخلوية. وكثيراً ما لوحظ تمايز خلوي عفوي خلال العبور الروتيني للخلايا، وغالباً ما يعطي خلايا شكلها كشكل خلايا الوريقة الداخلية المبكرة (الشكل 1D). وبينما استخدم العامل LIF خلال الأطوار المبكرة لبناء السلالات الخلوية، فقد لوحظ بالتالي عدم وجود تأثير له على نمو أو تمايز المستنبتات الخلوية المستقرة (غير موضح في الشكل). يحدث التمايز الخلوي سريعاً إذا ما حرمت الخلايا من الطبقة المغذية، حتى بوجود LIF (الشكل 1E). وبطريقة مماثلة، فإن تزويد وسط الاستنبات بمستقبل الانترلوكين interleukin-6 [IL-6] المنحل إضافة إلى الانترلوكين -6 لا يكون له تأثير في نمو أو تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية بظروف نمو قياسية، كما يفشل ذلك في إيقاف تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية في غياب طبقة مغذية (ليست موضحة في الشكل). نُمّيت السلالة الخلوية HES-1 في الزجاج لـ 64 دورة كما نميت السلالة HES-2 لـ 44 دورة، أي ما يعادل تضاعفاً في الجماعة الخلوية لـ 384 و 264 مرة تقريباً كحد أدنى، وللسلالتين بالترتيب، وبني التقدير على الزيادة المتوسطية في حجم المستعمرة لكل عبور، ورغم ذلك بقيت السلالتان كلتاهما مؤلفتين بصورة رئيسة من خلايا شكلها كشكل الخلايا الجذعية الجنينية ES. وقد نميت كلتا السلالتين بنجاح بعد عملية حفظ بالتجلد.

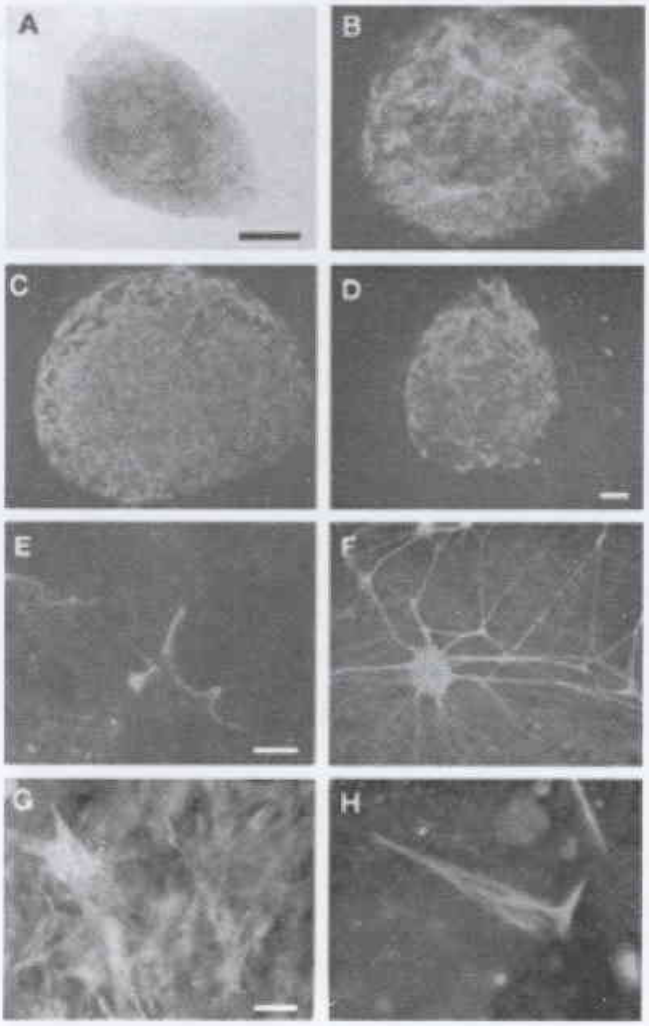
تعبيرية الواسمات الخلوية والأنماط النووية للخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية

نُفّذ تحليل للواسمات الخلوية والأنماط النووية لخلايا السلالة الخلوية HES-1 في الدورات التكاثرية 5-7، و14-18، و24-26، و44-64، كما نفذت هذه التحاليل لخلايا السلالة الخلوية HES-2 في الدورات: 6-8، و40-42. تملك الخلايا الجذعية الجنينية فعالية أنزيم الفسفاتاز القلوية alkaline phosphatase (الشكل 2A). أجري تنميط مناعي شكلي للخلايا الجنينية ES البشرية باستخدام سلسلة من الأضداد التي تكشف وجود الكربوهيدرات (السكريات) السطح خلوية والبروتينات المرتبطة بها على سطح الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية [11]. لقد تفاعلت الخلايا الجذعية الجنينية ES إيجابياً بطريقة المقايسة المناعية المتفلورة immunoflurescence assay باستخدام مضادات للمحددات المناعية epitopes الكربوهيدراتية SSEA-4 و TRA1-60، وكانت النماذج التلوينية مشابهة لتلك الملاحظة في الخلايا السرطانية الجنينية EC (الشكل C, 2B). تفاعلت الخلايا الجذعية الجنينية أيضاً مع الأضداد وحيدة النسيلة نمط GCTM-2، التي تكشف وجود محدد مناعي نوعي



الشكل 1– صور للخلايا الجذعية ES و ذريتها من الخلايا المتمايزة مأخوذة بمجهر متضاد الأطوار Phase contrast. (A) خلايا الكتلة الجنينية الداخلية بعد ثلاثة أيام من تصفيحها في وعاء الاستنبات. (B) مستعمرة من الخلايا الجذعية الجنينية ES. (C) صورة مجهرية مأخوذة بتكبير أعلى لمنطقة من مستعمرة خلايا جذعية جنينية ES. (D) منطقة من مستعمرة خلايا جذعية جنينية ES يطرأ عليها تمايز عفوي أثناء التدوير العادي للمستنبت. (E) مستعمرة بعد أربعة أيام من التصفيح بغياب طبقة خلوية مغذية و لكن بوجود 2000 وحدة/ ml^{-1} من hLIF بطرأ تمايز على ذريتها من الخلايا. (F) خلايا عصبونات في مستنبت عالي الكثافة. السلّم: (A,C)25 µm; (B,E) 100µm; (D,F)50 µm.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 2- تعبيرية الواسمات في الخلايا الجذعية الجنينية ES و خلايا ذريتها المتمايزة. (A) مستعمرة خلايا جذعية جنينية ES توضح التلوين الكيميائي النسيجي من أجل أنزيم alkalin phosphatase. (B) مستعمرة خلايا جذعية جنينية ES ملونة بالمضاد MC-813-70 متعرفاً على المحدد المناعي SSEA-4. (C) مستعمرة خلايا جذعية جنينية ES ملونة بالمضاد TRA1-60. (D) مستعمرة خلايا جذعية جنينية ES ملونة بالمضاد GCTM-2. (E) مستنبت عالي الكثافة الخلوية، لونت أجسام الخلايا واستطالاتها بمضاد بروتين الليفات العصبية kDa68. (F) مستنبت عالي الكثافة الخلوية، لونت تجمعات الخلايا وشبكة استطالاتها المنبثقة عنها بمضاد لـ N-CAM. (G) مستنبت عالي الكثافة الخلوية، لونت الخلايا التي تبدي ليفات سيتوبلازمية بمضاد خاص بالأكتين العضلي. (H) مستنبت عالي الكثافة الخلوية، لونت الخلايا التي تبدي ليفات سيتوبلازمية بمضاد خاص بالدسمين. السلّم: (A) 100 µm; (B-D,F) 200µm;(E,G,H) 50µm.

على اللب البروتيني لقالب حول خلوي يحوي الكيراتين سولفات keratine sulfate/ الكوندروئتين سولفات chondroitin sulfate البروتيوغليكان proteoglycan [12-14] الموجودة في الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية (الشكل 2D). ومثل الخلايا السرطانية البشرية، لاتعبّر الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية عن الواسم الخلوي SSEA-1، وهو واسم من أجل الخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية. وتحافظ كلتا السلالتين الخلويتين بثبات على نمط نووي طبيعي، وتشتق كلتاهما من أكياس أرومية أنثوية.

إن عامل الانتساخ Oct-4 عبارة عن الوجه POU من عامل انتساخ تكون تعبيريته محصورة بخلايا متعددة المقدرة عند الفأر، وتوضح نتائج حديثة مباشرة أن تعبيرية Oct-4 في البيضة الملقحة zygot ضرورية من أجل تكريس وجود جماعة خلوية جذعية متعددة المقدرة للكتلة الخلوية الداخلية ICM [15] في الكيس الأرومي. يركب Oct-4 كذلك في الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية، ويتراجع ضبط تعبيريته عندما تتمايز الخلايا. وباستخدام تقانة التفاعل السلسلي المعكوس للبوليميراز الناسخ (RT-PCR) للقيام بتحليل لـ mRNA على مستعمرات خلوية معزولة مؤلفة رئيسياً من خلايا جذعية، توضّح أن الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية تركب أيضاً Oct-4 (الشكل 3A، الأعمدة 2-4). لقد تمّ تنسيل منتجات PCR وسلسلتها وتوضيح كونها مماثلة لـ Oct-4 البشري (ليس موضحاً في الشكل).

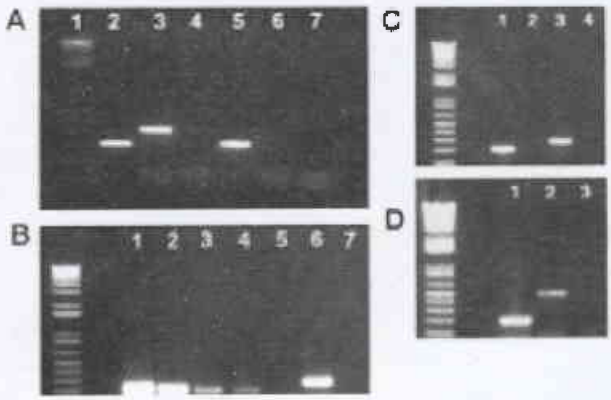
تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES في الطعوم الغيرية xenografts

عندما أُدخلت مستعمرات خلوية من HES-1 و HES-2 من كل من سوية دورة تكاثرية مبكرة (6؛ HES1 و 2) أو سوية دورة تكاثرية متأخرة (HES-1، الدورة 14 و 27، HES-2، الدورة 27) تحت محفظة خصية لفئران تعاني من عوز مناعي حاد مشترك (SCID)، تشكلت أذيات خصيوية أمكن جسها منذ الأسبوع الخامس تقريباً بعد هذا التطعيم. وقد طورت جميع الفئران أوراماً، وكانت كلتا الخصيتين مصابتين في معظم الحالات. وبإجراء تشريح لجثث autopsy الفئران لوحظت أذيات تتألف من كتل من الكيسات المملوءة بسائل باهت اللون (غير رائق) ومناطق من النسج الصلبة. ولم يكن هناك دليل كبير على انتشار أورام انتقالية إلى المواضع الأخرى في جوف البريتوان. ووضحت الفحوص النسيجية أن الأذيات قد أزاحت النسج الطبيعية للخصية (حلت محلها) واحتوت على مناطق أورام مسخية teratoma صلبة. ولم تلحظ سرطانات جنينية في أي من الأذيات الملاحظة. وقد تضمنت جميع الأورام المسخية (التشوهية) نسجاً تمثل جميع الطبقات الجنينية المولدة الثلاث. ولوحظت نسج متمايزة تضمنت غضروفاً، ظهارة رصفية، وريقة (أدمة) خارجية عصبية ابتدائية، بنى عقدية، عضلة، عظم، وظهارة غدية (الشكل 4). ولم تلحظ أجسام شبه جنينية في الطعوم الغيرية.

تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية في الزجاج

طرأ على كلتا السلالتين الخلويتين تمايز تلقائي تحت ظروف استنبات معيارية، ولكن يمكن تسريع عملية التمايز التلقائي تحت ظروف استنبات قريبة من المثالية (تحت مثالية). وبذلك، وكما هو الحال بالنسبة للخلايا السرطانية الجنينية ES البشرية، فإن استنبات خلايا هاتين السلالتين حتى درجة الكثافة الخلوية المرتفعة لمدة طويلة (من أربعة إلى سبعة أسابيع) دون استبدال الطبقة المغذية حثّ على تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية. وفي المزارع الخلوية ذات الكثافة العالية، كان تركيب واسم الخلايا الجذعية Oct-4 إما غير قابل للكشف أو بسوية الضبط الضعيف لدرجة كبيرة نسبة إلى سويات تعبيرية المورثة الخدمية house keeping الخاصة بالمركب B-actin (الشكل 3A، الأعمدة 5-7). وكشف وبسهولة المركب α - fetoprotein وتحت الوحدة β للمنمي التناسلي الكوريوني

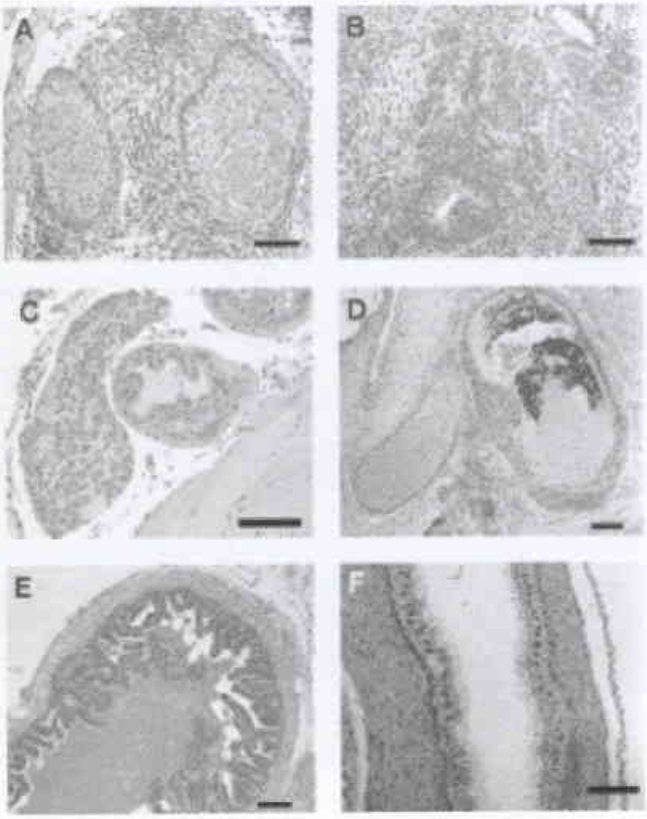
هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 3– تحليل التعبيرية المورثية بطريقة RT-PCR في الخلايا الجذعية الجنينية ES والخلايا المتمايزة المشتقة منها. (A) التعبير عن Oct-4 و B-actin في خلايا جذعية جنينية ES ومستنبتات خلوية عالية الكثافة. العمود 1، سلم عصابات DNA لشدف قياس 100 bp. العمود 2، لمستنبت خلايا جذعية، B-actin. العمود 3، لمستنبت خلايا جذعية، Oct-4. العمود 4، لمستنبت خلايا جذعية أجري PCR من أجل Oct-4 بحذف أنزيم النسخ المعكوس reverse transcriptase. العمود 5، لمستنبت عالي الكثافة الخلوية، Oct-4. العمود 6، لمستنبت عالي الكثافة الخلوية. العمود 7، لمستنبت عالي الكثافة الخلوية، أجري PCR بحذف أنزيم النسخ المعكوس من أجل Oct-4. إن قياس عصابة B-actin هو 200 bp وعصابة Oct-4 هو 320 bp. (B) التعبير عن nestin وPax-6 في الخلايا العصبية السلف. العمود الأيسر، سلم عصابات شدف DNA بقياس 100 bp. العمود 1، B-actin في السلالة الخلوية للورم الأرومي (الأصل) العصبي neuroblastoma من النمط HX 142 (ضبط إيجابي من أجل PCR النستين)، العمود 2، B-actin في الخلايا العصبية السلف. العمود 3، Nestin في السلالة الخلوية للورم الأرومي العصبي HX 142. العمود 4، Nestin في الخلايا العصبية السلف. العمود 5، PCR للنستين في العينة نفسها الموجودة في العمود 4 دون إضافة أنزيم النسخ المعكوس. العمود 6، Pax-6. العمود 7، PCR لـ Pax-6 العينة نفسها في العمود 6 دون إضافة أنزيم النسخ المعكوس. قياس عصابة النستين 208 bp، عصابة Pax-6 قياس 274 bp. (C) التعبير عن أنزيم glutamic acid decarboxylase (GAD) في مستنبتات من العصبونات. العمود الأيسر، سلم عصابات شدف DNA بقياس 100 bp. العمود 1، B-actin. العمود 2، PCR خاص بـ B-actin لنفس عينة العمود 1 دون إضافة أنزيم النسخ المعكوس. العمود 3، أنزيم (GAD). العمود 4، أنزيم (GAD) للعينة نفسها في العمود 3 دون إضافة أنزيم النسخ المعكوس. قياس عصابة 284 bp (GAD). (D) التعبير عن المستقبل $GABA_A\alpha 2$. العمود الأيسر، سلم عصابات شدف DNA قياس 100 bp. العمود 1، B-actin. العمود 2، المستقبل $GABA_A\alpha 2$. العمود 3، PCR دون إضافة أنزيم النسخ المعكوس. قياس عصابة تحت وحدة المستقبل $GABA_A\alpha 2$ هو 471 bp.

البشري (β-HCG) بطريقة المقايسة المناعية في السائل الطافي لمستنبتات خلوية منماة حتى درجة الكثافة العالية. إن fetoprotien - α منتج مميز لخلايا الوريقة (الأدمة) الداخلية ويمكن أن يعكس وجوده المميز تمايزاً في خلايا منحدرة من الوريقة الداخلية الخارج جنينية أو الداخل جنينية؛ وإن السويات الملاحظة (5.806-1.210 ng ml^{-1}) مؤشر قوي على وجود واسع للوريقة الداخلية. أما إفراز المنمي التناسلي الكوريوني البشري فهو مميز لتمايز خلايا تعود للطبقة الأرومية (الأصلية) المغذية trophoblast؛ وتتوافق السويات الملاحظة (54.6-6.4 IU/L) مع كمية قليلة من التمايز في هذا الخط الخلوي.

وفي المستنبتات الخلوية عالية الكثافة هذه، لم تكن هناك نماذج متناسقة من البنى المتعضية التي توحي بوجود تشكلات من أجسام شبه



الشكل 4– صور مجهرية للبنية النسيجية لعناصر متمايزة صودفت في ورم مسحي تشكل في حصية الفئران SCID بعد تطعيمها داخلاً بمستعمرات السلالة الخلوية HES-1 وHES-2. (A) غضروف وظهارة رصفية، HES-2. (B) وريدات عصبية، HES-2. (C) عقدة، غدة، وعضلة مخططة، HES-1. (D) عظم وغضروف، HES-1. (E) ظهارة غدية، HES-1. (F) ظهارة عمودية مهدبة، HES-1. السلم: 100 µm (A.E)، 50µm (F).

جنينية مماثلة لتلك المتشكلة في التجمعات الخلوية للخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية أو تلك الناشئة من هنا وهناك في مستنبتات الخلايا الجذعية الجنينية ES للقريد الأمريكي marmoset [8]. لقد أدّى استنبات كتل من الخلايا الجذعية الجنينية ضمن أوعية استنبات الخلايا بالقطرة المعلقة، أو كتجمعات خلوية في أطباق بتري الباكتريولوجية، في وسط استنبات معياري بدون وجود الطبقة المغذية إلى موت خلوي كبير، ولم يتبقَ حياً سوى عدد ضئيل من هذه التجمعات الخلوية. ولم يكن هناك دليل على نمو أو تشكل طبقات نسيجية واضحة ضمن التجمعات الخلوية. وعندما أعيد تصفيح الخلايا للتجمعات الخلوية في أوعية استنبات نسيجية بلاستكية ضمن وسط استنبات معياري، كان الموت الخلوي واضحاً، ولم يحدث نمو خلوي توسّعي فيها. وبذلك فإن المناقلات المجهرية المستعملة في مخبرنا وفي المخابر الأخرى الهادفة إلى تسهيل تشكيل أجسام شبه جنينية وحدوث تمايز متعدد السلالات الخلوية للخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية قد حرّضت على موت الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية.

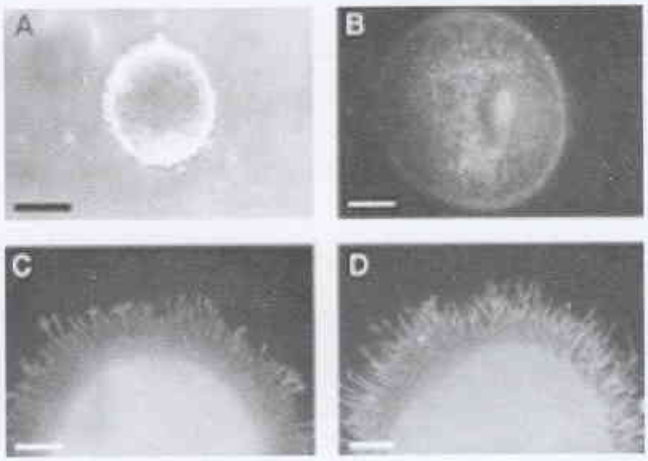
وعلى الرغم من ذلك، يمكن تحقيق تمايز خلوي جسمي تحت ظروف خاصة كإطالة مدة الاستنبات، الذي يسمح ببقاء الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية حيّة ولكنه لا يسمح بنمو خلايا جذعية وغير ملائمة لتمايز

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

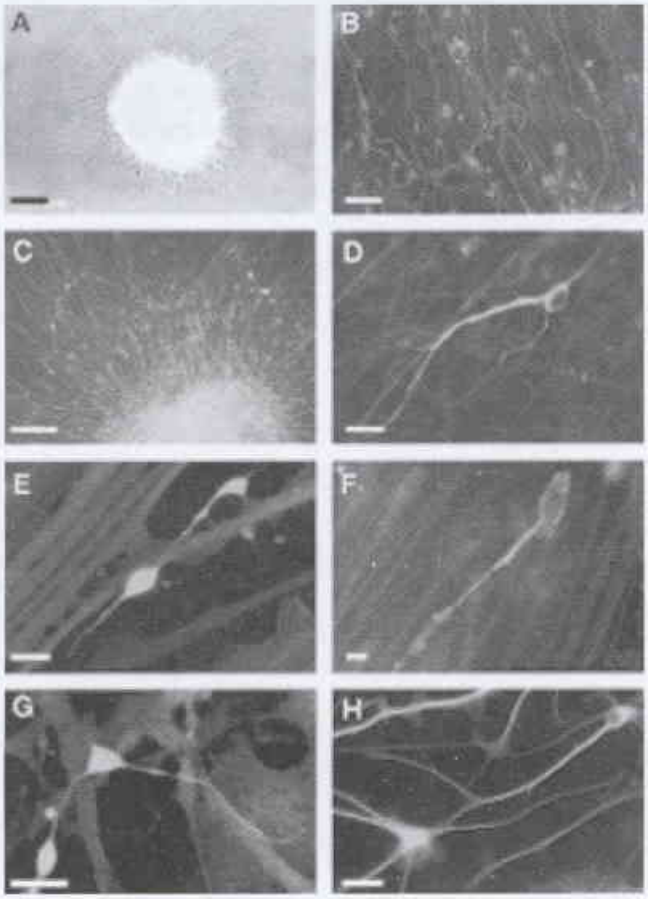
واسع لخلايا خارج جنينية. وبعد استنبات طويل الأمد حتى درجة الكثافة المرتفعة (من أربعة إلى سبعة أسابيع)؛ تشكّلت تجمعات متعددة الخلايا أو بنى حويصلية فوق مستوى الطبقة الواحدة، ولاحظنا بين هذه البنى تجمعات عنقودية من الخلايا أو خلايا مفردة ذات استطالات طويلة تمتد بعيداً عن أجسام الخلايا، مشكلة شبكة بتماسها خلايا أخرى (الشكل 1F). وقد تلونت الخلايا والاستطالات الخلوية إيجابياً بأضداد مضادة لبروتينات الليفات العصبية ولجزيء اللصوقية الخلوية العصبي (N-CAM، الشكل- 2E, F). كما لوحظت عضلة تقلصية أيضاً في هذه المستنبتات وبصورة نادرة. وعلى الرغم من أن مصادفة عضلة تقلصية أمر نادر الحدوث، فإننا غالباً ما لاحظنا حزماً من الخلايا تلونت إيجابياً بأضداد مضادة لأشكال نوعية من الأكتين Actin العضلي، وبدرجة أقل شيوعاً لاحظنا خلايا تحتوي على دسمين desmin الليفات الوسيطة (الشكل 2G,H).

عزل وتمايز خلايا السلف العصبية من مستنبتات الخلايا الجذعية ES البشرية

لقد كشفت المراحل المبكرة من تمايز نمط الوريقة الخارجية العصبية أولاً في مستنبتات منماة لثلاثة أسابيع تقريباً ذات كثافة خلوية عالية ظهور مناطق تحتوي على خلايا ذات امتدادات خلوية قصيرة أبدت وجود المركّب N-CAM متعدد السياليك. وعند ذلك، يمكن تحديد مناطق من المستعمرات الخلوية تنشيء خلاياها هذه الامتدادات في المستنبتات عالية الكثافة الخلوية بملاحظة ملامح بنيوية شكلية مميزة بمجهر متباين الأطوار أو بمجهر تجسيم. لقد عُزلت هذه المناطق الخلوية وأعيد تسطيحها في أوعية استنبات في وسط خال من السيروم (المصل)، حيث شكلت هنا بنى كروية الشكل خلال 24 ساعة (الشكل 5A). أظهرت الخلايا في هذه البنى الكروية في البدء واسمات خاصة بالوريقة الخارجية العصبية الابتدائية، مثل المركب N-CAM متعدد السياليك (الشكل 5B)، ومثل بروتينات nestin (تلوين مناعي، الشكل 5C ,RT-PCR)، الشكل 3B) vimentin (الشكل 5D) الخاصة بالليفات الوسيطة، ومثل عامل الاستنساخ Pax-6 (الشكل 3B). وعند تصفيح هذه الخلايا على ركيزة ملائمة، ارتبطت الكريات معاً، ونمت منها خلايا متمايزة بعيداً فوق الطبقة الواحدة (الشكل 6A). لقد توضحت هذه الخلايا المتمايزة شكلياً وأبدت تعبيرية لواسمات بنيوية مميزة للتمايز العصبي الناضج، مثل بروتينات الليفات العصبية بوزن 200 kDa ومركب b-tubulin (الشكل 6B و H). علاوة على ذلك، أظهرت الخلايا المتمايزة واسمات نوعية خاصة بالعصبونات الناضجة مثل بروتينات الليفات العصبية بوزن 160 kDa (الشكل 6C)، Map2a + b (الشكل 6D)، وsynaptophysin (الشكل 6F)، و b-tubulin (الشكل 7H). إضافة إلى ذلك أخيراً، احتوت



الشكل 5- صور مأخوذة بمجهر متضاد الأطوار وتحليل كيميائي مناعي تعبيريه و سمات في الخلايا العصبية السلف عزلت من مستنبتات خلايا جذعية جنينية ES متمايزة. (A) صورة بالمجهر متضاد الأطوار لكرية تشكلت في وسط خالٍ من السيروم. (D-B) تلوين وميضي مناعي غير مباشر لكريات، بعد أربع ساعات من التصفيح على ركيزة لاصقة، من أجل N-CAM، nestin، وvimenting، بالتتالي. في C وD، وضعت الخلايا الموجودة في قاعدة الكرية في مستوى التأثير لإظهار تلون الليفات؛ يكشف الفحص التأثيري المساند أن الخلايا الموجودة في أرجاء الكرية قد رصعت بكلا المضادين. السلم: 100 µm في جميع العينات.



الشكل 6- المظهر تحت مجهر متضاد الأطوار وتعبيرية الواسمات في مستنبتات عصبونات مشتقة من خلايا سلف وضحت في الشكل 5. (A) صورة بمجهر متضاد الأطوار لخلايا متمايزة مبثقة من كرية مصفحة فوق سطح لاصق. (H-B) صور مجهرية بتقانة الوميض المناعي غير المباشر لخلايا متمايزة مرصعة بمضادات مضادة (B) لبروتين ليفات عصبية 200 KDa، (C) لبروتين لليفات عصبية 160 KDa، (D) لـ MAP2Abatb، (E) للغلوتامات، (F) لـ synaptophysin، (G) لأنزيم GAD، و(H) لـ B-tubulin. السلم: (A,B) 100µm, (C) 200µm, (D) 20 µm, (E,F)10µm, (G)20 µm, (H) 25µm.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

المستنبتات على خلايا تركب الغلوتامات glutamate (الشكل 6E)، وأيضاً الأنزيم المحدد لمعدل التفاعل الخاص بالتركيب الحيوي لـ GABA (أنزيم glutamic acid decarboxylase، الشكل 3C والشكل 6G)، إضافة إلى تحت وحدات المستقبل الخاص بالناقل العصبي الأخير ($GABA_A$ α2-receptor subunit)، الشكل 3D).

المناقشة

تشبه سلالات الخلايا الجذعية الجنينية ES التي عزلناها في خصائصها تلك الموصوفة من قبل تومسون وزملائه [10] وتشترك في كثير من الصفات التفصيلية مع الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية متعددة المقدرة التشكلية ومع الخلايا الجذعية الجنينية ES للقرد. وتشمل الصفات التفصيلية المشتركة للخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية متعددة المقدرة تلقائية التمايز [4،16] والخلايا الجذعية الجنينية ES للرئيسات [7، 8، 10] وهذا التقرير شكلية متشابهة، وإظهار محددات مناعية epitopes سطحية من الكربوهيدرات (SSEA-3 و4- وTRA1-60 وTRA1-81) والغليكانات البروتينية proteoglycans للقالب حول الخلوي الذي يكشف بـ GCTM-2 (الذي يحمل المحدد المناعي TRA1-60 [14])، والمقدرة الكامنة التشكلية العديدة، وغياب الاستجابة لـ LIF أو غيره من العناصر القريبة من عائلة هذا السيتوكين. وتختلف الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية المشتقة من الكيس الأصلي بطريقة ما عن سلالات الخلايا الجذعية المشتقة من الخلايا الأصلية المنشئة من قبل شاملوت وزملائه [17]، والتي لا تنمو على شكل طبقات مسطحة، وتبدي المحدد النوعي SSEA-1 على سطحها، وتعتمد جزئياً على الأقل على LIF الخارجي المنشأ وعلى عامل النمو الأرومي الليفي الأساسي.

تختلف الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية والقردية والخلايا السرطانية الجنينية EC لهما جوهرياً عن الخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية في المستوى الشكلي، والتعبير عن الواسم السطحي، والاستجابة لـ LIF. وربما نشأت الفروق بين الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية والفأرية من فروق جوهرية في التطور الجنيني بين الأنواع، أو ربما تعكس فرقاً في المرحلة الجنينية لأصل (منشأ) الخلايا الجذعية الجنينية ES عند الفأر والرئيسات. يبدي كل من أصل الخلايا الجذعية الجنينية ES والخلايا السرطانية الجنينية EC الفأرية البشرية عامل الانتساخ Oct-4 ثم تنخفض تعبيرية هذا العامل خلال مرحلة التمايز الخلوي. وعند الفأر، تنحصر تعبيرية Oct-4 في الجماعات الخلوية متعددة المقدرة الكامنة وقد تبين حديثاً أن ذلك ضروري من أجل بناء سلالات متعددة المقدرة الكامنة خلال التطور الجنيني الفأري [15]. ويمكن أن يكون Oct-4 أحد الأعضاء الصغيرة من الجزيئات الضابطة المميزة لجميع الخلايا متعددة المقدرة الكامنة للثدييات في جميع مراحل التطور الجنيني.

يتضح من هذه الدراسة ومن دراسة تومسون وزملائه [10] أن الاستنبات في وجود خلايا أرومية ليفية جنينية يمكن أن يدعم بناء الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية واستنباتها التسلسلي المعزولة من الأكياس الأرومية بتواترات مرتفعة نسبياً. وتزودنا هذه النتائج المشجعة بنقطة بدء لتطبيقات مستقبلية سريرية أكثر حقيقية وأكثر شفافية لتقانة الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية. إن لأنظمة استنبات الخلايا الجذعية الجنينية ES الحالية محدودياتها. يحدث التمايز التلقائي مباشرة، ولايستطيع نظام الاستنبات دعم النمو النسيلي للخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية. وحتى الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية يصعب جعلها تمر في دورة نمو كخلايا مفردة وتبدي فعالية انتسال منخفضة نسبياً. ومن الممكن أن عوامل النمو الغدية الذاتية autocrine growth factors التي تنتجها الخلايا الجذعية للرئيسات بذاتها ضرورية ومطلوبة من أجل تجديد جماعة الخلايا الجذعية. وتجدر الملاحظة، ولأنه لم يتم الانتسال بعد لخلايا جذعية بشرية متعددة المقدرة التشكلية مضاعفة المجموعة الصبغية diploid، إلى أن هناك إمكانية ضئيلة لوجود أكثر من نمط خلوي واحد في المستنبتات و هذا يمكن أن يتواءم مع تنوع الخلايا المتمايزة الملاحظة في الزجاج وفي الحي.

إننا نوثق حدوث تمايز خلوي جسمي في الزجاج لخلايا جذعية جنينية ES بشرية مشتقة من أكياس أرومية لأول مرة في هذا التقرير. وكما تبين من أجل الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية سابقاً [4]، فإن خلايا جذعية جنينية ES منماة لمدة زمنية طويلة بكثافة خلوية عالية دون تجديد الطبقة المغذية تُشَكِّل تجمعات خلوية وبنى حويصلية وجدت بداخلها جميع أنماط الخلايا المتمايزة، بما في ذلك عصبونات وعضلة. لقد حُصل على تمايز خلوي جسمي تحت ظروف تحدُّ من تجديد الخلية الجذعية دون تحريض الموت الخلوي مما يوقف التمايز الوحيد المنحى في النسيج الخارج جنيني. ومن المرجح أن التآثرات بين الخلايا المتنوعة في المراحل المبكرة من التمايز الخلوي تقلد بصورة لابنائية العمليات التحريضية الحاصلة أثناء تشكيل المحاور الجنينية [18] في الجنين. ويسهل تعيين العوامل المتورطة في هذه التآثرات التمايز الموجه للخلايا الجذعية. وهناك بيانات مفتاحية من العمل على الخلايا السرطانية الجنينية EC البشرية تشير، وبصورة مشابهة للخلايا الجنينية للعديد من الأنواع، إلى أن الخلايا الجذعية البشرية متعددة المقدرة يمكن أن تحرَّض للتمايز إلى مسارات سلالات خاصة استجابة إلى عمل أعضاء من عامل النمو التحولي β - superfamily- transforming growth factor، [6، 19، 20].

ومن المثير مقارنة خصائص الأسلاف العصبية الموصوفة هنا مع أسلاف الخلايا الجذعية العصبية المأخوذة من الدماغ البشري الجنيني [21] أو الناضج [22]. إن عزل هذه الأسلاف العصبية في شكل نقي من مستنبتات متمايزة لخلايا جذعية جنينية ES بشرية يوضح أن كلاً من الجماعات الخلوية السلف المحددة المنحدرة من خلايا جذعية جسمية وذريتها المتمايزة يمكن أن يحصل عليها من مستنبتات خلايا جذعية جنينية ES بشرية تعاني من تمايز متعدد السلالات. وتوضح هذه الاكتشافات كذلك فائدة الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية من أجل القيام بدراسات أساسية للمراحل المبكرة من تكريس بناء سلالات الخلايا الجذعية الجسمية.

ويُكرس في الوقت الحاضر اهتمام أكبر إلى التطبيقات الواعدة الإمكانات للخلايا الجذعية في البيولوجيا والطب. إن الخصائص المتمثلة في تعددية المقدرة الكامنة والديمومة (المرتبطة بتعبيرية telomerase [10]) هي خصائص فريدة للخلايا الجذعية الجنينية ES وتمكن الباحثين من مقاربة العديد من النسج في البيولوجيا البشرية وفي الطب ولأول مرة.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

يمكن للخلايا الجذعية الجنينية ES ذات المقدرة الكامنة أن تسد العجز في مسألة النسج المعطاة (المقدمة) للاستخدام في عملية الازدراع، وخصوصاً عندما لايستطيع نظام استنبات بديل دعم نمو الخلايا الجذعية المطلوبة المحددة. ولكن تجدر الملاحظة أن معظم التطبيقات الفعالة الواسعة الطيف لتقانة الخلايا الجذعية في الطب البشري- البحوث الجنينية الأساسية، الدراسات الوظيفية للجينوم، عوامل النمو ومكتشفات العقاقير، علم السموم، والازدراع الخلوي- مبنية على افتراض إمكان إنماء الخلايا الجذعية الجنينية ES في مدرج نمو واسع، لإدخال تعديلات وراثية فيها، ثم توجيه تمايزها. تقف أنظمة البحث الحالية بعيداً عن هذه الأهداف، ولكن هناك مؤشرات إلى حصول بعض التقدم في هذا المجال. إن تعيين عوامل جديدة تقود نمو الخلايا الجذعية متعددة المقدرة الكامنة [16، 23، 24]، أو طرائق انتخاب خلايا جذعية لحذف التأثير المثبط للخلايا المتمايزة [25]، يعرضان طريقة متقدمة لتوسيع نمو الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية و انتسالها. إن اكتشافنا أن الخلايا الجذعية تعبر عن Oct-4 و تخفف ضبط تعبيريته خلال عملية التمايز الخلوي يشير بقوة إلى أن انتخاب الخلايا الجذعية باستخدام مورثات مقاومة للعقاقير تحت إشراف الجزء المحضض promoter لمورثة Oct-4 سيكون طريقاً مفيداً لمناقلة الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية. إن التمايز الخلوي الموجّه باستخدام عوامل نمو، و قد نوقشت هذه المسألة سابقاً، أو باستخدام خطة استكمالية للانتخاب السلالي المقرون بالتعزيز بعوامل نمو [26] (الممثل هنا بالتعيين الشكلي و عزل السليفات العصبية) يمكن أن يمكّن من انتخاب جماعات من الخلايا السلف المحددة من خلايا تتمايز تلقائياً، كما شرح هنا. وبتأمين الدعم الملائم من عموم الناس و التعاون المفتوح بين العاملين في هذا الحقل، يُرجّح أن النتائج المؤثرة للخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية في البيولوجيا والطب ستُعادل أو حتى تفوق قريباً ذاك الأثر الناتج من الثورة التي حققتها مثيلتها، الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية.

الطرائق التجريبية

اشتقاق و مكاثرة الخلايا الجذعية الجنينية ES

تمَّ الحصول على الأكياس الأرومية البشرية اللازمة لهذه الدراسة تبعاً لمصادقة الهيئة المرجعية لمعهد الدراسة و الموافقة المسبقة لأزواج يخضعون للإلقاح في الزجاج I. V. F في سنغفورة، حيث أنشئت السلالات الخلوية المذكورة في هذه الدراسة. استنبتت البيوض الملقحة حتى مرحلة الكيس الأرومي (اليوم السادس بعد دخول النطفة)، في أوساط متتالية، طبقاً لطريقة الاستنبات المعدلة الخاصة بنا [27]، وبعد هضم الغشاء الشفيف zona pellucida بالبروناز st. pronase (Louis, MO، سيغما sigma)[28]. عزلت الكتلة الخلوية الداخلية ICM بطريقة الجراحة المناعية [29] باستخدام أضداد مصلية مضادة للبشر (سيغما Sigma) متبوعة بالتعريض لمتممة خنزير الهند، Guinea pig (Life Technologies Gaithersbusg, MD). وبعد ذلك، استنبتت الخلايا ICM فوق طبقة مغذية من الأورمات الليفية الجنينية الفأرية المعطلة الانقسام الخلوي بـ mitomycin-C (عزلت من أجنة بعمر 13.5 يوماً بعد الاقتران من السلالة الفأرية 129/Sv أو من أفراد الجيل الأول F_1 الناتج من تهجين فرد من السلالة السابقة مع آخر من السلالة C57/BL6، تركيز خلايا الطبقة المغذية 75.000 خلية/cm^{-2} في أطباق استنبات نسيجية مطلية بالجيلاتين. ويتركب وسط الاستنبات من وسط Eagle المعدل لـ (DMEM Dulbecco، بدون بيروفات الصوديوم، 4500 mgL^{-1} من الغلوكوز، Life Technologies Rockville، MD) مدعم بسيروم جنيني بقري بنسبة 20% (FBS, Hyclome,Logan, UT) ومركب β-mercaptoethanol تركيز 0.1 mM، وحموض أمينية غير أساسية بنسبة 1%، مركب glutamine تركيز 2 mM، البنسلين بتركير 50 وحدة/ ml^{-1} ، وستربتومايسين بتركيز 50 (Life Technologie) μgml^{-1}. وخلال عزل الخلايا الجنينية ES والمراحل المبكرة من استنباتها، زود الوسط بعامل التثبيط اللوكيمي البشري المؤشب (hLIF) بتركيز 2.000 وحدة/ ml^{-1} (Armad, Melbourne, Australia). وبعد التصفيح البدئي بستة أيام إلى ثمانية أيام، رفعت تجمعات خلوية شبيهة بالكتلة الخلوية الداخلية ICM المستنبتة آلياً بواسطة ممصات دقيقة من براعم النمو البارزة من خلايا متمايزة ثم أعيد تصفيحها فوق طبقة مغذية جديدة. تكاثرت المستعمرات الخلوية الناتجة لاحقاً إلى تجمعات خلوية في كل تجمع عدد من الخلايا لا يزيد عن المئة من الخلايا الشبيهة بالجذعية، فوق الطبقة المغذية الفأرية، و بمعدل كل سبعة أيام. فصلنا التجمعات الخلوية إما آلياً، أو بطريقة مختلطة من التشريح اليدوي المتبوع بالتعريض إلى محلول أنزيمي من dispas (تركيز Life Techologie, 10 mg ml^{-1}). وفي بعض التجارب، صنعت تحت مستنبتات للتجمعات الخلوية فوق أطباق استنبات نسيجي في وسط معياري مزود بـ hLIF تركيز 2.000 وحدة / ml^{-1} أو تشكيلة من IL-6 (2ng ml^{-1}) ومستقبل منحل (33ng ml^{-1}, R&D IL-6 systems, Minneapolis,MN) في غياب طبقة خلوية مغذية. و في تجارب أخرى، صنعت تحت مستنبتات لتجمعات خلوية في وسط معياري في قطرة معلقة بحجم 25µl، أو في أطباق استنبات باكتريولوجية، قبل التصفيح فوق بلاستيكات الاستنبات النسيجي.

تمييز الخلايا الجذعية

تثبت المستعمرات الخلوية في أطباق الاستنبات بواسطة الإيتانول تركيز 100% من أجل الإظهار المناعي المتألق لواسمات الخلايا الجذعية السطحية TRA1-60, GCTM-2 و SSEA-1، بينما استخدم الأستون بتركيز مائي 90% من أجل تثبيت SSEA-4. أما مصادر الأضداد وحيدة النسيلة المستعملة لكشف الواسمات فكانت كما يلي: GCMT-2 من المخبر الذي أجري فيه هذا البحث، TRA1-60 هدية من ب. أندريف P. Andrews من جامعة Sheffield (MC-480) SSEA-1, و (MC-813-70) SSEA-4 من بنك دراسات تطور الهجن الخلوية Hybridoma (Iowa city, IA). نفذ توضع الضد باستخدام غلوبيولينات مناعية أرنبية مضادة للفأر مقرونة بمركب fluorescein (Dako, Carpinteria, CA) isothiocyanate. أظهرت فعالية أنزيم الفسفاتاز القلوية كما هو موصوف في [30]. استُخدمت تقانة العصابات الصبغية G المعيارية في الأنماط النووية المعزولة.

دراسات تعبيرية Oct-4

نفذت طريقة RT-PCR على مستعمرات مؤلفة بغالبيتها العظمى من خلايا جذعية من أجل تقصي التعبيرية المورثية Oct-4 أو نفذت على

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

مستعمرات عانت خلاياها من تمايز تلقائي كما شرح أعلاه. عزل mRNA على كريات ممغنطة (Dynal AS, Oslo) بعد حل الخلايا طبقاً لتعليمات المصنِّع، ونفذ تركيب لـ cDNA أول شريط بالطور الصلب باستعمال أنزيم الانتساخ العكسي Superscript II reverse transcriptase (Life Technologie). وكان تنفيذ طريقة PCR الخاص بـ Oct-4 مماثلاً لطريقة van Eijk ومساعديه [31] باستعمال cDNA الطور الصلب كقالب تركيب فعال template وأنزيم Taq polymerase (Pharmacia Biotech, Hong Kong). وكضبط جودة لـ mRNA، قمنا بمقايسة مستنسخات β-actin باستعمال طريقة RT-PCR والمرئسة primer التالية: 5-CGCACCACTGGCATTGTCAT-3 (للأمام) والمرئسة: 5-TTCTCCTTGATGTCACGCAC-3 (بالعكس). حللت النواتج في هلامة agarose تركيز 1.5% وظهرت بالتلوين ethidium bromide.

تشكيل الأورام المسخة في الفئران SCID

في وقت إجراء الدورات التكاثرية العادية، قطفت تجمعات خلوية بنحو 200 خلية في كل تجمع محتوية على خلايا غير متمايزة شكلياً كما وصف أعلاه، وحقنت داخل خصي فئران SCID بعمر نحو أربعة إلى ثمانية أسابيع (السلالة CB17 من معهد Melbourne, Walter and Eliza Hall أستراليا)، وبنحو 10-15 تجمع خلوي في كل خصية. وبعد نحو ستة إلى سبعة أسابيع، ثبتت الأورام الناتجة في محلول الفورمالين المعتدل الموقي بتركيز 10%، أُدمجت ضمن قوالب البارافين، قطعت وفحصت نسيجياً بعد التلوين بالهيماتوكسيلين - أيوزين.

التمايز في الزجاج

استنبتت مستعمرات فوق طبقة من الخلايا الأرومية الليفية الجنينية الفأرية المعطلة انقسامياً حتى درجة الاحتشاد (نحو أسبوعين أو ثلاثة أسابيع) ولاحقاً حتى سبعة أسابيع بعد دورة نمو. جدد الوسط كل يوم، ثم قيست سويات α-fetoprotein وتحت الوحدة β من المنمِّي التناسلي الكوريوني البشري (BhCG) في الوسط المعدل بـ HES-1 و HES-2 في سوية الدورتين 17 و 6 بالتتالي. وبعد أربعة إلى خمسة أسابيع من الاستنبات، قطف الوسط المعدل بعد 36 ساعة من آخر تبديل للوسط وعينت سويات البروتين بواسطة مقايسة مناعية أنزيمية مترية خاصة immunoenzymometric assays (Eurogenetics, Tessenderllo, Belgium) وطريقة مقايسة مناعية أنزيمية مترية بالتألق fluorometric enzyme immunoassay (Miami, FL, Dade) ، بالتتالي. ولم تكشف هذه البروتينات في وسط شاهد معدل بطبقة مغذية فقط.

ثبتت المستنبتات المتمايزة بعد ثلاثة إلى سبعة أسابيع من دورة النمو (الدورة 26 من أجل HES-1 والدورة 9 من أجل HES-2 للتقصي بتقانة الوميض المناعي لواسمات نوعية سلالية. وبعد التثبيت بالإيتانول 100%، استخدمت أضداد وحيدة النسيلة نوعية من أجل تقصي بروتين ليفي عصبي حجم 60 kDa (Amersham, Uk) و N-CAM (Uj13a, Dako).

كما تمَّ تقصي الأكتين actin والدسمين desmin باستخدام أضداد وحيدة النسيلة (D33 وHHF35، Dako، بالتتالي) بعد التثبيت بمزيج ميتانول أسيتون (1:1). وحددت مواضع الأضداد كما شرح أعلاه.

عزل وتمييز الخلايا السلف العصبية والخلايا المشتقة منها

عُينت تجمعات من الخلايا مقدرة لإعطاء خلايا طلائع عصبية بواسطة ملامحها الشكلية المميزة في المناطق العصبية لمستعمرات الخلايا الجذعية الجنينية ES المتمايزة لكلا السلالتين الخلويتين بعد ثلاثة أسابيع من التصفيح (النشر). قطعت المستنبتات آلياً بواسطة محاقن دقيقة وأعيد تصفيحها في وسط طازج جديد خال من السيروم. وقد شكلت بنى كروية الشكل خلال 24 ساعة. وقد صفحت الكريات على سواتر رقيقة مغطاة بالحمض الأميني poly-D-lysine (30-kDa70، من سيغما sigma) و اللامينين laminin (من سيغما sigma)، ثبتت بعد 4 ساعات، و فحصت بالتحليل المناعي الوميضي غير المباشر من أجل كشف تعبيريتها عن N-CAM (التثبيت بالأسيتون، و المعالجة بالضد كما شرح أعلاه)، وعن النستين nestin (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 4%، و المعالجة بضد مصل أرنبي، هدية لطيفة من الدكتور ر. ماكي R. McKay)، وعن الفيمينتين vimentin (التثبيت بالميثانول، والمعالجة بضد وحيد النسيلة Vim3B4 من NSW, Castle Hill, Roche Diagnostic Australia. كشفت تعبيرية β-actin، nestin (مرئسات Primers[22])،وعامل الانتساخ Pax-6 (مرئسات 22) في الكريات بتقانة RT-PCR كما شرح أعلاه.

وفي بعض التجارب، استنبتت الكريات المصفحة في وسط حالٍ من السيروم مزود بـ (1μM) حمض trans-retinoic acid لمدة 7-15 يوماً، وحللت الخلايا النامية منها بالوميض المناعي غير المباشر من أجل تعبيرية الواسمات التالية: بروتين الليفات العصبية 200kDa (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 4%، المعالجة بالضد وحيد النسيلة الفأري RT97 من Novocastra, Newcastle, UK)، بروتين الليفات العصبية 160kDa (التثبيت بالميتانول، المعالجة بالضد وحيد النسيلة الفأري NN18 من Roche) MAP2tab; (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 4%، المعالجة بالضد وحيد النسيلة الفأري AP20 من Union, Newmarkers, City CA)، الغلوتامات glutamate (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 1% والغلوتار ألدهيد 1%، والمعالجة بضد سيروم أرنبي من سيغما Sigma)، synaptophysin (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 4%، والمعالجة بالضد وحيد النسيلة الفأري SY38 من Dako)، glutamic acid decarboxylase (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 1%، الغلوتار ألدهيد 1%، والمعالجة بضد السيروم الأرنبي من Temecula, CA Chemicon)، β-tubulin (التثبيت بالبارافورم ألدهيد 4%، والمعالجة بالضد وحيد النسيلة الفأري TUB2.1 من سيغما Sigma)، ونفذ تحليل بطريقة RT-PCR من أجل كشف تعبيرية β - actin، glutamic acid decarboxylase (مرئسات 32)، و تحت الوحدة α2 للمستقبل $GABA_A$ (مرئسات 33) كما وصف أعلاه.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

REFERENCES المراجع

[1] Evans, M. J. & Kaufman, M. Establishment in culture of pluripotential stem cells from mouse embryos. Nature 292, 151-156 (1981).

[2] Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 7634-7638 (1981).

[3] Andrews, P. W. et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Lab. Invest. 50, 147-162 (1984).

[4] Pera, M.F., Cooper, S., Mills, J. & Parrington, J.M. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma-cells. Differentiation 42, 10-23 (1989).

[5] Thompson, S. et al. Cloned human teratoma cells differentiate into neuron-like cells and other cells types in retinoic acid. J. Cell Sci. 72, 37-64 (1984).

[6] Pera, M.F. & Herszfeld, D. Differentiation of pluripotent teratocarcinoma stem cells induced by bone morphogenetic protein-2. Reprod. Fertil. Devel. 10, 551-556(1999).

[7] Thomson, J.A. et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7844-7844 (1995).

[8] Thomson, J.A. et al. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrix jacchus) blastocysts. Biol. Reprod. 55, 254-259 (1996).

[9] Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C. & Ratnam, S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Hum. Reprod. 9, 2110-2117 (1994).

[10] Thomson, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282,1145-1147 (1998).

[11] Andrews. P.W et al. Comparative-analysis of cell-surface antigens expressed by cell-lines derived from human germ-cell tumors. Int. J. Cancer 66, 806-816 (1996).

[12] Cooper, S., Pera, M.F., Bennett, W. & Finch, J. T. A novel keratan sulfate proteoglycan from a human embryonal carcinoma cell-line. Biochem. J. 286, 959-966 (1992).

[13] Pera, M.F. et al. Analysis of cell-differentiation lineage in human teratomas using new monoclonal-antibodies to cytostructural antigens of embryonal carcinoma-cells. Differentiation 39,139-149 (1988).

[14] Badcock, G., Pigott, C., Goepel, J. & Andrews, P.W. The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulphate proteoglycan. Cancer Res. 59, 4715-4719 (1999).

[15] Nichols, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 95, 379-391 (1998).

[16] Roach, S., Cooper. S., Bennett, W. & Pera, M.F. Cultured cell lines from human germ cell tumours: windows into tumour growth and differentiation and early human development. Eur. Urol. 23, 82-88 (1993).

[17] Shamblott, M.J. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13726-13731 (1998).

[18] Beddington, R.S.P. & Robertson, E.J. Axis development and early asymmetry in mammals. Cell 96, 195-209 (1999).

[19] Andrews, P.W et al Inhibition of proliferation and induction of differentiation of pluripotent human embryonal carcinoma cells by osteogenic protein-1 (or bone morphogenetic protein 7). Lab. Invest. 71, 243-251 (1994).

[20] Caricasole, A. D. et al. In Inhibin, activin and follistatin: regulatory functions in system and cell biology (eds Aono, T., Sugino, H. & Vale, W.W.) 308-311 (Springer, New York, NY; 1997).

[21] Flax, J.D. et al. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. Nat. Biotechnol, 16, 1033-1039 (1998).

[22] Kukekov, V.G. et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. Exp. Neurol. 156, 333-344 (1999).

[23] Dani, C. et al. Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells-a new ES cell regulatory pathway. Dev. Biol. 203, 149-162 (1998).

[24] Rathjen, J. et al. Formation of a primitive ectoderm like cell population. EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. J. Cell Sci. 112, 601-612 (1999).

[25] McWhir, J. et al. Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. Nat. Genet. 14, 223-226 (1996).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[26] Li, M., Pevny, L, Lovell-Badge, R. & Smith, A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Curr. Biol. 8, 971-974 (1998).

[27] Fong, C.Y. & Bongso, A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. Hum. Reprod. 14, 774-781 (1999).

[28] Fong, C.Y. et al. Ongoing pregnancy after transfer of zona-free bastocysts: implications for embryo transfer in the human. Hum. Reprod. 12, 557-560 (1997).

[29] Solter D. & Knowles, B. Immunosurgery of mouse blastocyst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5099-5102 (1975).

[30] Buehr, M. & Mclaren, A. Isolation and culture of primordial germ cells. Methods Enzymol. 225, 58-76 (1993).

[31] van Eijk, MJ et al. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. Biol. Reprod- 60, 1093-1103 (1999).

[32] Vescovi, A.L. et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. Exp. Neural. 156, 71-83 (1999).

[33] Neelands. T.R. et al. $GASA_A$ receptor pharmacology and subtype expression in human neuronal NT2-N cells. J. Neurosci. 18, 4993-5007 (1998).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

تمايز الطلائع العصبية القابلة للازدراع المأخوذة من خلايا جذعية جنينية بشرية في الزجاج*

س - ش. زهانغ وزملاؤه
قسم التشريح وعلم الأعصاب والعلوم الطبية - جامعة ويسكنسن - الولايات المتحدة الأمريكية
م. ورنغ، أ. بروستل
قسم علم الأمراض العصبية - جامعة بون - ألمانيا

ملخص

إن إمكانيـة التـامي الرائعة والقدرة على التضاعف عند الخلايا الجذعية الجنينية (ES) البشرية تبشّر بتأمين مورد غير محدود من أنماط خلوية نوعية لصالح المعالجات بالازدراع العلاجي، وسوف نصف هنا التمايز في الاستنبات في الزجاج in vitro والتخصيب والازدراع لخلايا طليعية عصبية مأخوذة من خلايا جذعية جنينية (ES) بشرية. فلدى تكديس أجسام خلوية جنينية، قامت الخلايا الجذعية الجنينية (ES) المتمايزة بتشكيل أعداد كبيرة من بنى مشابهة للأنابيب العصبية بوجود عامل نمو الأورومات الليفية fibroblast growth factor (FGF-2). وقد تمّ عزل الطلائع العصبية الموجودة داخل هذه التشكلات عن طريق الهضم الأنزيمي الاصطفائي، و من ثمّ تنقيتها بالاستناد إلى الالتصاق التمايزي . وبعد نزع العامل FGF-2 تمايزت هذه الطلائع العصبية إلىعصبونات وخلايا دبقية نجمية وخلايا دبقية قليلة التغصن. وبعد ازدراعها في دماغ فأر حديث الولادة، اندمجت الطلائع العصبية المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية (ES) البشرية في تشكيلة متنوعة من مناطق الدماغ، حيث تمايزت إلى عصبونات وخلايا دبقية نجمية. ولم يلاحظ أي تشكل ورمي غريب في المتلقيات الازدراعية. وتصور هذه النتائج الخلايا الجذعية الجنينية (ES) البشرية كمصدر للطلائع العصبية القابلة للازدراع لغرض ترميم وإصلاح الجهاز العصبي.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية جنينية، علاج بالازدراع، طلائع عصبية، خلايا نجمية، تمايز.

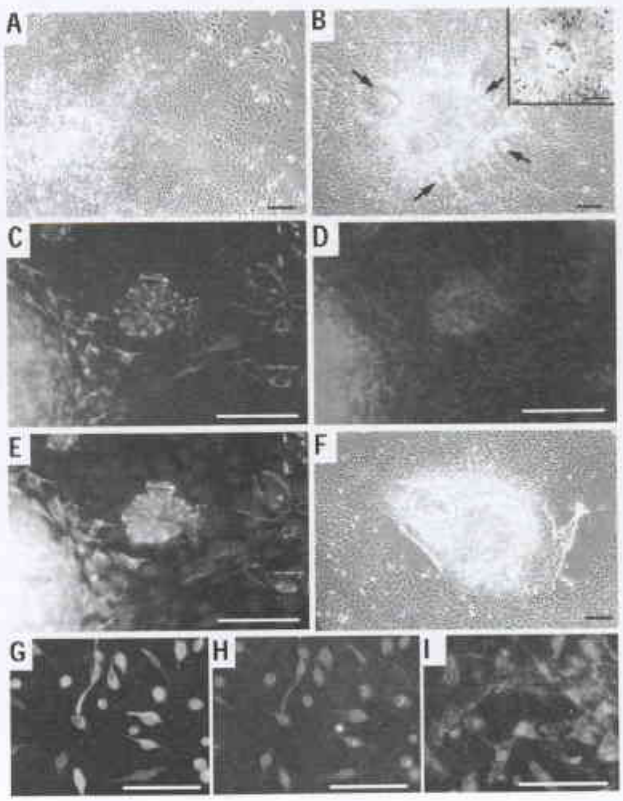
إن الخلايا الجذعية الجنينية (ES) البشرية خلايا وافرة الإمكانات تشتق من الكتلة الخلوية الداخلية للجنين قبل الازدراع في جدار الرحم [1]. وعلى غرار الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية، فإن الخلايا الجذعية الجنينية البشرية يمكن أن تزداد إلى أعداد كبيرة مع الحفاظ على إمكانيتها للتمايز إلى أنماط خلوية جسمية متنوعة تخص كل الطبقات المنشئة الجنينية الثلاث [1-4]. ويهيّئ تمايز خلايا ES هذه في الزجاج آفاقاً جديدة لصالح دراسة الآليات الخلوية والجزيئية للتنامي المبكر وتوليد خلايا مانحة لأجل المعالجات الازدراعية. وفي الواقع، فقد وجد أن خلايا ES الفأرية تتمايز في الزجاج إلى أنماط خلوية عديدة ذات صلة بالنواحي السلبية بما فيها الخلايا المكونة للدم [5]، والخلايا العضلية القلبية [6]، والخلايا المفرزة للأنسولين [7]، والعصبونات والدبق العصبي [8-12]. وبعد ازدراعها في الجهاز العصبي المركزي (CNS) للقوارض، وجد أن الطلائع العصبية المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية (ES) قد تتكامل داخل النسيج المضيف [12]. وتثمر في بعض الحالات تحسناً وظيفياً [13]. إن الاستخدام السريع للخلايا الجذعية الجنينية البشرية إنما يتطلب توليد خلايا مانحة رفيعة النقاء من أجل نسج وأعضاء نوعية. وسوف نصف هنا استراتيجية بسيطة ولكنها فعّالة في عزل طلائع عصبية قابلة للازدراع من مستنبتات خلايا جذعية جنينية بشرية آخذة بالتمايز.

النتائج

تتمايز الخلايا الجذعية الجنينية (ES) البشرية لتشكّل بُنىً تشبه الأنبوب العصبي، وذلك بوجود العامل FGF-2. لقد تمّ إكثار سلالات خلوية جذعية جنينية (ES) بشرية H9, H1، وسلالة نسيلية مشتقة من H9 و H9.2 [4] على طبقة مغذية من أورومات ليفية جنينية فأرية مشعّعة [1]. ولأجل استهلال التمايز، جرى نزع مستعمرات خلوية جذعية جنينية (ES) ومن ثمّ تنميتها في معلّق أجسام جنينية (EBs) embryoid bodies لمدة أربعة أيام. وبعد ذلك تمّ استنبات هذه الأجسام EBs في دورق استنبات نسيجي معالج، وذلك في وسط محدد كيميائياً [14، 15] يحتوي العامل FGF-2. وبعد خمسة أيام من الاستنبات في عامل النمو FGF-2، ولّدت هذه الأجسام الجنينية المطلية EBs نامية بارزة من خلايا مسطحة. وفي الوقت نفسه لُوحظ عدد متزايد من خلايا صغيرة متطاولة في مركز هذه الأجسام الجنينية EBs الآخذة بالتمايز (الشكل 1A). وبحلول اليوم السابع لوضعها في ذلك الوسط المحدد ولّدت الخلايا

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Nature Biotechnology*, Vol.19, December 2001. ترجمة الدكتور محي الدين عيسى - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



الشكل 1- تمايز وعزل الطلائع العصبية المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية (ES). الصورة (A) جسم جنيني (EB) مرتبط ينمو بوجود العامل FGF-2 لمدة خمسة أيام وخلايا مسطحة في المحيط وخلايا متطاولة صغيرة متجمعة في المركز. الصورة (B) بعد سبعة أيام تظهر عدة تشكلات (وريداتية) rosette (الأسهم) في وسط الجسم الجنيني (EB) المتمايزة. وفي داخل الصورة مقطع بثخانة 1µm للتشكل الورياتي ملون بأزرق التولويدين تظهر فيه خلايا موشورية الشكل مرتبة في بنية أنبوبية. قضيب، 20µm. الصور (E-C) خلايا داخل أكداس من الوريدات (أسفل الصورة وعلى اليسار) و وريدة ناشئة صغيرة في المركز تكون موجبة للنستين (C) والموساشي -1(D)، بينما الخلايا المسطحة المحيطة تكون سلبية. أما (E) فهي صورة مشتركة تضم (C) و(D) تظهر فيها نوى الخلايا موسومة بـ(DAP1). الصورة (F) بعد المعاملة بأنزيم الديسباز dispase لمدة عشرين دقيقة انكمشت التشكلات الوريداتية بينما بقيت الخلايا المسطحة المحيطة مرتبطة. الصور (G-I) تكون الخلايا المعزولة موجبة التلوين للنستين في نسق خيطي (G) وللموساشي -1 في السيتوبلازما (H) وللPSA-NCAM في الغشاء على وجه الخصوص (I). لقد جرى تلوين جميع النوى بالملون DAP1. قضبان = 100µm.

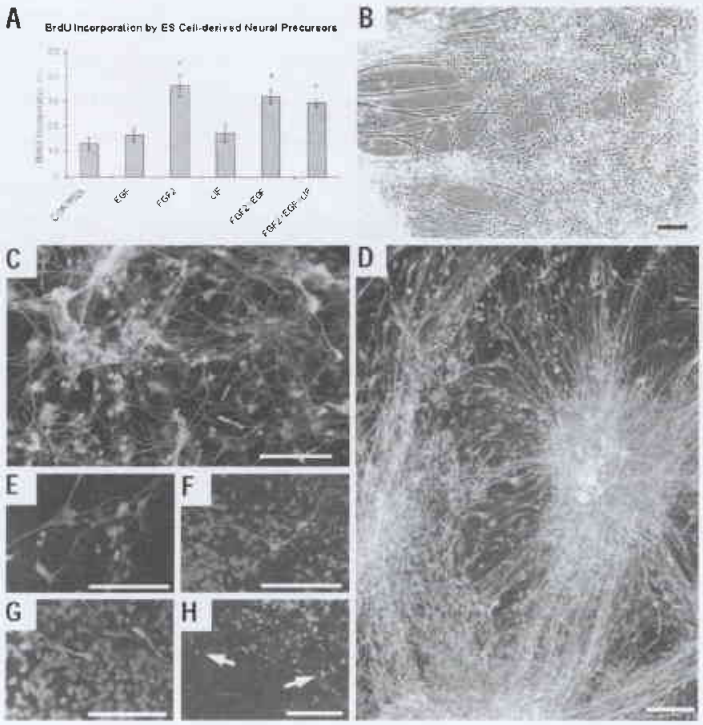
المركزية الصغيرة المتطاولة تكوينات وردية (الشكل 1B) مشابهة للأنبوب العصبي المبكر كما يتبيّن في المقاطع الملونة بأزرق التولويدين (الصورة المدرجة في الشكل 1B).

وقد كشفت تحاليل الفلورة المناعية عن أن تعبير المستضدّين الواسمين العصبيين نستين nestin وموساشي واحد Musashi-1 [16،17] اقتصر إلى درجة كبيرة على الخلايا الكائنة في التكوينات الوردية، وليس على الخلايا المسطحة الكائنة في محيط الأجسام الجنينية EBs المتمايزة (الشكل 1C-E). وقد كانت الخلايا المسطحة سلبية المناعة فيما يخص بضعة واسمات لعصبونات وخلايا دبقية متمايزة هي الخيط العصبي neurofilament 68 و 04 و 01 والبروتين الحمضي الليفي الدبقي (GFAP). وكذلك كانت سلبية أيضاً للفسفاتاز القلوية، بينما كانت الخلايا الجذعية الجنينية ES غير المتمايزة موجبة المناعة حسبما ورد في جهات أخرى. إن خلايا ES غير المتمايزة كانت سلبية تجاه الواسمات الظهارية العصبية المختبرة. وقد لُوحظ تشكّل البُنى شبه الأنبوبية العصبية في غالبية الأجسام الجنينية EBs في حال وجود العامل FGF-2 (94% من مجموع الثلاثمئة والخمسين جسماً جنينياً EBs من سلالتي H9 وH9.2 في ثلاث تجارب منفصلة). ولم تلاحظ أيّ وُرَيدات rosette حسنة التشكّل لدى غياب العامل FGF-2. يمكن عزل الوُرَيدات التي تشبه الأنبوب العصبي بواسطة المعالجة الأنزيمية التفاضلية والالتصاق. وبالتعرّض المستمر إلى العامل FGF-2، تمدّدت الخلايا الوردية الموشورية وشكلت عدة طبقات. وغالباً ماشكّلت معظم الجسم الجنيني EB وتميزت بشدة عن الخلايا المسطحة المحيطة بها. إن المعالجة بالدسباز dispase أدّت إلى انفصال تفضيلي للجزر الظهارية العصبية المركزية تاركة الخلايا المحيطة ملتصقة إلى درجة كبيرة (الشكل 1F). أما الخلايا المنفردة الشوائبية فقد تمّ انفصالها بواسطة الالتصاق القصير الأمد على أطباق الاستنبات الخلوي. ولقد بيّن التعداد الخلوي الفوري بعد هذا العزل وعملية التخصيب أن الخلايا المرافقة للأكداس العصبية الظهارية المعزولة قد مثلت 72% إلى 84% من الخلايا في مستنبتات الأجسام الجنينية EB المتمايزة. أظهرت التحاليل المناعية الخلوية الكيميائية أن 96±0.6% من خلايا الوُرَيدات المعزولة كانت موجبة التلوين بالنستين بالاستناد إلى فحص 13.324 خلية في أربع تجارب منفصلة، وكانت الغالبية العظمى من هذه الخلايا كذلك إيجابية للموساشي -1 ولجزيء الالتصاق الخلوي العصبوني الذي يرمز له بـ (PSA-NCAM) أيضاً (الشكل 1G-I).

تنتج الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES البشرية جميع الأنماط الخلوية الثلاثة للجهاز العصبي في المستنبت الزجاجي. ولقد انتشرت الطلائع العصبية المعزولة متمدّدة كأكداس خلوية عائمة حرة في معلّق الاستنبات مما يشبه مستنبتات الكرات العصبية المشتقة من النسج الدماغية لجنين بشري مكتمل [14،18-24]. وقد كشفت دراسات دمج البروموديوكسي يوريدين (BrdU) أن تنشيط تكاثر الخلايا الطليعية يعتمد على العامل FGF-2، ولايمكن إثارته بواسطة EGF ولا بواسطة عامل تثبيط اللوكيميا (LIF) وحدهما. وعلاوة على ذلك، فإنه لم يلاحظ أي تأثيرات جمعية أو تآزرية لدى الجمع بين FGF-2 وEGF و/ أو LIF (الشكل 2A). وقد انشطرت الكرات العصبية المشتقة من خلايا ES مرة كل أسبوعين، كما أبقت على ما يصل إلى ثمانية مقاطع جرى تمايزها إلى عصبونات ودبق عصبي في نسق يشبه المقاطع المبكرة (انظر في الأسفل).

لقد تمّ تحريض تمايز الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES في الزجاج عن طريق حذف العامل FGF-2 والتلبيس plating على ركازة أورنيتين ornithine ولامينين laminin. ففي غضون أيام قليلة، تنمو خلايا فرادى ونتوءات عديدة من الكرات، مما يعطي مظهراً نجمياً. وبعد مضي 7-10 أيام من التلبيس، شكّلت النتوءات المنبعثة من الكرات حزماً ليفية بارزة. وكثيراً ما شوهدت خلايا مهاجرة صغيرة مرافقة للألياف (الشكل 2B)، ولقد كشفت تحاليل الفلورة المناعية للمستنبتات المتمايزة أن الغالبية

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



الشكل 2- توصيف الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES في مزارع الزجاج. (A) يتحسن اندماج BrdU بالطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES المتفككة في حال وجود العامل FGF-2 (20 ng/ml) وليس العامل EGF (20ng/ml) أو العامل LIF (5ng/ml). وتعتبر هذه معطيات تمثيلية من واحدة من ثلاث تجارب تضاعفية. ونشير العلامات النجمية إلى اختلاف بين مجموعة التجربة والمجموعة الشاهدة (students t-test n=4. $p<0.01$). ولم يؤثر EGF ولا LIF بمفرده على سرعة اندماج BrdU. كما لم تحصل أية تأثيرات تآزرية عند ضم LIF مع أي من EGF أو FGF بمفرده (لا يظهر بالصور). (B) يظهر تمايز كداسة من الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES لمدة ثلاثة أسابيع (حزماً عصباتية) neurite bundles مترافقة مع خلايا مهاجرة على طول مسيرها. (C) يبيّن التلوين المناعي بعد ثلاثة أسابيع من التمايز أنّ الأغلبية من الخلايا يكوّن عصبونات موجبة التيوبيولين β_{III}-tubulin (الأحمر) وأن القليل فقط من الخلايا تكون خلايا نجمية موجبة لـ (GFAP) (الأخضر). (D) بعد 45 يوماً من التمايز تظهر أعداد كثيرة من الخلايا النجمية موجبة $GFAP^+$ (الأخضر) مترافقة مع عصيات neurites موجبة $NF200^+$ (الأحمر والمصفر يُعزى إلى التداخل باللون الأخضر GFAP). (G-E) تجسد العصبونات المشتقة من خلايا ES ذات المورفولوجيات المختلفة (نواقل عصبية) متميزة مثل الغلوتامات glutamate (E) والغاما GABA (F) وأنزيم هدروكسيلاز التيروزين (G). تظهر خلايا قليلة التغصنات وموجبة التفاعل $O4^+$ (الأسهم) بعد أسبوعين من التمايز في وسط لتمايز الخلايا الدبقية (H). قضبان =100 µm.

العظمى من الخلايا في المناطق النامية تجسد واسمات عصبونية هي MAP2ab و β_{III}- tubulin (الشكل 2C). أما تجسيد الخيوط العصبية ذات الوزن الجزيئي المنخفض والعالي، فقد شوهد بعد [7-10] أيام و [10-14] يوماً من التلبيس على التوالي (الشكل 2D). وقد استخدمت أضداد لنواقل عصبية مختلفة من أجل التوصيف اللاحق للعصبونات المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية (ES). بينما أظهرت غالبية العصبونات النمط الظاهري الغلوتاماتي الفعل (الشكل 2G)، وكانت نسبة صغيرة قد وسمت بضد لحمض غما أمينو بيوتريك (GABA). وكثيراً ما أبدت هذه العصبونات شكلية مورفولوجية قطبية (الشكل 2F). وقد وجد عدد صغير من العصبونات يعبّر ويجسد الأنزيم هدروكسيلازتيروزين (TH) (الشكل 2G)، الذي هو الأنزيم المحدّد للسرعة في اصطناع الدوبامين dupamine. أما الخلايا النجمية $GFAP^+$ فقد ندر وجودها في غضون الأسبوعين الأولين بعد استبعاد عامل النمو (الشكل 2C)، ولكنها ازدادت وفرة بعد التمايز المطول في الزجاج. وبعد ستة إلى سبعة أسابيع شكّلت هذه الخلايا النجمية طبقة واسعة أسفل العصبونات المتمايزة (الشكل 2D). وبينما لم تشاهد خلايا يلة التغصن في شروط الاستنبات المعيارية، فقد شوهد قليل من الخلايا المستجيبة المناعية (O4) ذات المورفولوجية الدبقية القليلة التغصنات النموذجية عندما تمّ استنبات الخلايا بوجود عامل النمو A المشتق من الصفيحات PDGF-A [14] لفترة تفوق الأسبوعين (الشكل 2H). وتظهر خلايا الطلائع العصبية المشتقة من سلالات خلوية جذعية جنينية ES هي H1 وH9 وH9.2 نمطاً مشابهاً من التمايز العصبي. وهكذا استطاعت الطلائع العصبية المشتقة عن خلايا ES توليد جميع الأنماط الخلوية الرئيسة الثلاثة للجهاز العصبي المركزي CNS.

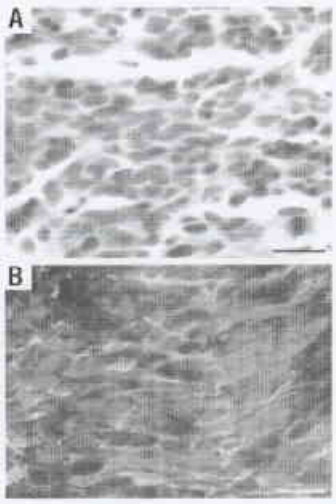
تهاجر الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES البشرية، وتندمج وتتمايز في الوسط الحي. ولتقييم تمايز الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES البشرية في الوسط الحي قمنا بإزدراعها في البطينات الجانبية لفئران حديثة الولادة [21]. وهنا شكّلت الخلايا المزدرعة أكداساً في مناطق مختلفة من الجهاز البطيني، واندمجت بأعداد كبيرة في تشكيلة منوعة في مناطق المخ المستضيفة. كما لُوحظ توسع طفيف في الجهاز البطيني لبعض متلقي الفريسة. ولدى تحليل 22 دماغاً، بعد مضي أسبوع إلى أربعة أسابيع من الازدراع، وجدنا أكداساً داخل بطينية وخلايا مندمجة في 19 دماغاً متلقياً فيما يخص الأكداس وفي 18 دماغاً فيما يخص الخلايا المندمجة. وهكذا فإن أغلبية الحيوانات المزدرعة احتوت على الأكداس والخلايا المندمجة كلتيهما. وقد أظهرت الأفراد الحيوانية التي جرى تحليلها بعد فترات أطول أن الخلايا المزدرعة كانت قابلة للكشف بعد ثمانية أسابيع على الأقل من الازدراع. وكانت الأكداس تتألف من خلايا كثيفة التجمع ومتجانسة التوزع تبدي استجابة مناعية للأضداد المضادة للنستين و التيوبيولين β_{III} وMAP2ab (الشكل 3). ولم تجسد GFAP إلّا خلايا قليلة في التكدسات. وكانت الأكداس داخل البطينية والخلايا المانحة المندمجة سلبية للفسفاتاز القلوية وللسيتوكيراتين cytokeratin، اللتين تعتبران واسمتين تتجسدان بشكل نموذجي في خلايا ES غير المتمايزة في الظهارات غير العصبية. ولم تلاحظ أي أورام مسخية غريبة.

لقد أثبت تهجين DNA في الموضع بمسبار نوعي بشري والكشف المناعي الكيميائي النسيجي عن مستضد بشري نوعي بالنواة وجود الخلايا المزدرعة في مناطق دماغية عديدة، إذ تضمنت ساحات المادة السنجابية، التي تبدي اندماج خلايا مانحة على نطاق واسع، كلاً من قشرة المخ (الشكل 4A)، والحصين (الشكل 4B,C)، والبصلة الشمية والحاجز

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

septum، (الشكل 4D) والمهاد والوطاء (الشكل 4E) والجسم المخطط (الشكل 4F) والدماغ المتوسط (الشكل4G). وبعد أربعة أسابيع من الازدراع أظهر القياس الكمّي للخلايا المندمجة في ثلاث مناطق منتقاة كثافات خلوية قدرها 35 خلية (في القشرة) و24 خلية (في الجسم المخطط) و 116 خلية في السقف (tectum) لكل مقطع بحدود 50µm (ثم أخذ العدد المتوسط من أربعة حيوانات وثلاث مقاطع لكل منطقة).

أما الاندماج في مناطق المادة البيضاء فقد كان أوضح ما يكون في الجسم الثفني وفي المحفظة الداخلية وفي المسالك الليفية الحصينية. من الناحية المورفولوجية، كانت الخلايا البشرية المندمجة غير قابلة للتمييز عن الخلايا المضيفة المحيطة بها، ولايمكن كشفها إلا باستعمال واسمات نوعية بشرية (الشكل 4)، وقد أظهر الوسم المضاعف بالأضداد النوعية للنمط الخلوي أن الخلايا المندمجة قد تمايزت إلى عصبونات وخلايا دبقية. وأمكن استقصاء أعداد كبيرة من العصبونات المشتقة من خلايا ES البشرية بوضوح باستخدام أضداد التيوبيولين β_{III} وMAP2 (الشكل 4H,J). فكثيراً ما أظهرت هذه العصبونات مورفولوجيات ثنائية القطب ذات نتوءات طويلة (الشكل 4H)، يضاف إلى ذلك العثور على عصبونات ذات عصيات neurites متعددة الأقطاب (الشكل 4J). أما العصبونات المشتقة من المانح، فقد ولّدت محاوير axons عديدة تبرز مسافات طويلة في أعماق الدماغ المضيف، وقد أمكن اكتشافها في المادة البيضاء والمادة السنجابية كلتيهما. بيد أنها كانت وفيرة العدد بصورة خاصة ضمن مسالك ليفية من أمثال الجسم الثفني والملتقى الأمامي والخيمة الحصينية، حيث أمكن تتبعها مراراً لمسافة عدة مئات من المكرومتر في مقطع واحد (الشكل 4I). وإضافة إلى العصبونات، تمّ اكتشاف عدد قليل من خلايا نجمية مشتقة من خلايا ES في النسيج الدماغي المضيف. وقد أبدت هذه الخلايا مورفولوجيات نجمية stellate كما أظهرت تعبيراً (تجسيداً) قوياً لGFAP (الشكل 4K). وعلى النقيض من ذلك، فالوسم المضاعف للخلايا البشرية المندمجة بأضداد بروتينات النخاعين أخفق في كشف خلايا بالغة قليلة التغصنات. وقد احتفظت بعض الخلايا المانحة التي هاجرت إلى أعماق الدماغ المضيف بالنمط الظاهري الإيجابي للنستين حتى فترة أربعة أسابيع بعد الازدراع. تمّ العثور على العديد من هذه الخلايا في مواقع حول وعائية perivascular.



الشكل 3- تظهر في الصورة خلايا مانحة متكدسة في البطينات المتلقية. وبعد الازدراع في فئران حديثة الولادة تشكل الخلايا المزدرعة كداسات داخل بطينية ذوات مورفولوجية ظهارية عصبية بدائية حسبما هو مبيّن بتلوين الهيماتوكسيلين وبتلوين الايوزين (A). (B) تبدي الخلايا المتكدسة استجابة مناعية لأضداد النستين (الأخضر) ولأضداد التيوبيولين (β_{III}) الأحمر. أما النوى فقد لُونت بالمقابل بالهوكست Hoeckst (الأزرق).

المناقشة

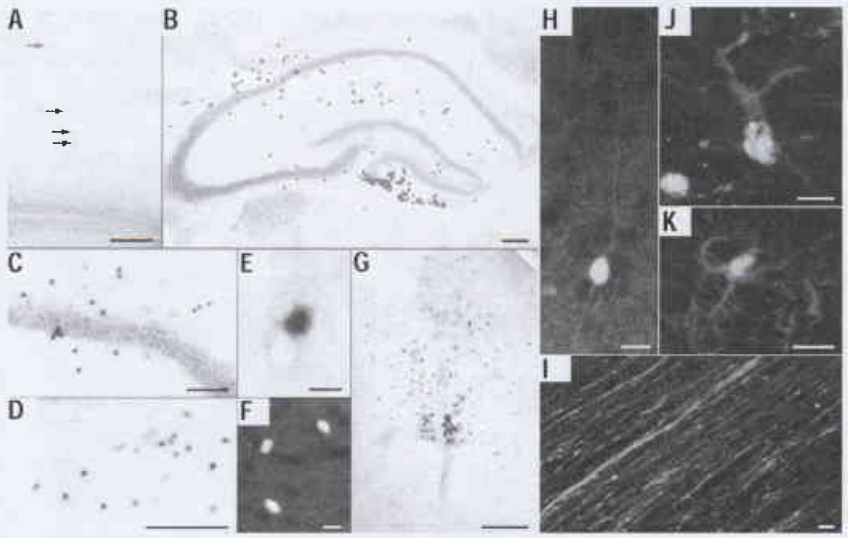
تشير الدراسة الحالية إلى أن الطلائع العصبية القابلة للازدراع والقادرة على توليد عصبونات ناضجة وخلايا دبقية يمكن إعدادها بكميات كبيرة انطلاقاً من خلايا جذعية جنينية ES بشرية. وباستخدام المعاملة بعامل النمو والالتصاق التفاضلي للخلايا الطليعية العصبية تهيئ لنا عملية التمايز في الزجاج الموصوفة هنا أرضية مناسبة لدراسة التنامي العصبي ولتوليد خلايا مانحة يمكن استخدامها في الإصلاح أو الترميم الممكن للجهاز العصبي .

يتمثل الاكتشاف المهمّ في هذه الدراسة بملاحظة ن تمايز الطلائع العصبية في الزجاج انطلاقاً من خلايا جذعية جنينية (ES) بشرية يبدو أنه يعيد ويلخص الخطوات المبكرة لتنامي الجهاز العصبي فيما يخص تشكيل البُنى العصبية شبه الأنبوبية. وقد سُجلت ملاحظات مماثلة لدى الازدراع داخل البطيني لطلائع عصبية مشتقة من خلايا ES فأرية في داخل الدماغ الجنيني لجرذ [12]. وعلى عكس هذه الدراسة السابقة، فإن دراستنا وجدت أن الخلايا البشرية لم تشكّل بُنىً عصبية شبه أنبوبية إلّا في الزجاج فقط. ومن منظور التنامي، فإن هذه الظاهرة يمكن أن تفيد كوسيلة تجريبية في دراسات تشكّل الأنبوب العصبي البشري في شروط مقننة.

أما على المستوى الواقعي، فإن توليد البنى شبه الأنبوبية العصبية في الزجاج وإمكانية عزل هذه البُنى استناداً إلى التصاقها التفاضلي إنما يهيئ طريقة بسيطة ولكنها فعّالة لتوليد طلائع عصبية مشتقة من خلايا ES بشرية على درجة عالية من النقاء. وبالتحديد فإن نقاط التماس القوية بين خلية وخلية في داخل البنى العصبية الظهارية والتصاقها الضعيف بركازة الاستنبات النسيجي تسمح بالعزل الاصطفائي للخلايا العصبية بدون حدوث تلوث أو التعرّض لشوائب من طرف خلايا السلالات الجسمية الأخرى. وقد أبدت نسبة تفوق على 95% من الخلايا المعزولة النمط الظاهري الموجب للنستين، ولم تُلاحظ أيّ خلايا ES أو ظهارات غير عصبية لدى متلقي الأغراس. ولما كانت الخلايا ES غير المتمايزة والطلائع التابعة لسلالات أخرى يمكن أن تشكّل أوراماً وأنسجة أجنبية، فإن توليد جماعات خلوية جسمية صافية يمثّل مطلباً رئيساً لتطوير استراتيجيات ازدراع عصبي مبني على خلايا ES.

لقد سبق لروبينوف Reubinoff وزملائه أن ذكروا التمايز في الزجاج وعزل طلائع عصبية مشتقة من خلايا ES بشرية [2]. وفي تلك الدراسة، لُوحظ التمايز العصبي لأول مرة في مستنبتات نمت لمدة ثلاثة أسابيع بكثافة عالية على طبقة مغذية، وذلك بظهور ساحات تحوي خلايا ذات نتوءات قصيرة جسدت PSA-NCAM. إن هذه الأكداس الخلوية التي جرى تحديدها بواسطة المورفولوجية المميزة ضمن خليط من خلايا ES المتمايزة، والتي تمّ استخلاصها بعدئذ يدوياً بواسطة ممصّ مكروي، وإعادة تلبيسها في وسط خالٍ من المصل قد شكّلت بُنىً كروية. وعلى العكس، فإن طريقتنا الإجرائية تسمح بعزل أنزيمي فعّال للخلايا العصبية الظهارية المتولّدة بوجود FGF-2. ويبقى بحاجة للتوضيح ما إذا كان تأثير FGF-2 الملاحظ في منظومتنا يعود بالدرجة الأولى إلى تحريض عصبي أو إلى تنشيط التكاثر.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 4- يظهر في الصورة اندماج وتمايز الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES في الوسط الحي. فالخلايا المزدرعة يتم كشفها بالتهجين في الموضع. مع مسبار لعنصر التكرار ALU البشري (G,E-A) أو بفعل ضد لمستضد نووي بشري نوعي (F). (A) خلايا مانحة فرادى في القشرة المخية المضيفة لتلقّ عمره ثمانية أسابيع (الأسهم). (B) اندماج واسع للطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES في التشكّل الحصيني. الخلايا المهجنة مع المسبار ALU البشري مرئية لونياً بالنقط الحمر. (C) خلايا بشرية مندمجة بالقرب من الطبقة الهرمية الحصينية في P14. (D) خلايا مشتقة من خلايا ES في الحاجز septum لفأر متلقّ عمره أربعة أسابيع. (E) صورة مكبرة بدرجة عالية لخلية مانحة إفرادية في الوطاء (الهيبوثلاموس). مع ملاحظة التكامل عديم الالتحام بين خلايا المضيف المتجاورة وغير الموسومة. (F) خلايا مانحة في الجسم المخطط لمضيف عمره أربعة أسابيع، تمّ الكشف عنها بضد لمستضد نووي خاص بالبشر. (G) هجرة واسعة للخلايا المزدرعة من القناة المائية إلى داخل الدماغ المتوسط الظهري. (H) خلايا مشتقة من خلايا ES البشرية في القشرة المخية لمضيف عمره أسبوعان، مظهرة مورفولوجية قطبية وبروزات طويلة وقد تمّ الوسم المضاعف للخلية بأضداد ليواسم نووي خاص بالبشر (الأخضر) وبالتيوبيولين β_{III} (الأحمر). (I) شبكة محاوير عصبية مشتقة من الخلايا المانحة في منطقة الخيمة fimbria من الحصين، وقد تمّ تحديدها بفعل ضد لخيط عصبي بشري. (J) عصبون متعدد الأقطاب مشتق من خلايا مانحة. وقد تمّ وسمه المضاعف بأضداد تتعرف على الأشكال المتساوية a و b من MAP2 (الأحمر) والنوى البشرية (الأخضر). (K) خلية نجمية مشتقة من خلية ES في القشرة المخية لحيوان عمره أربعة أسابيع وقد تمّ وسمها المضاعف بواسم نووي بشري (الأخضر) وبضد لـ(GFAP) (الأحمر). ويلاحظ أن كل حالات الوسم المضاعفة كانت .صور بؤرية مجهرية تؤكدها الصور الضوئية المفردة .

تهيّئ المنظومة الاستنباتية المحددة كيميائياً والموصوفة هنا فرصة لاستكشاف تأثيرات العوامل المنفردة على التكاثر الظهاري العصبي البشري وعلى التوصيف في الزجاج .

إن الطلائع المشتقة من خلايا ES البشرية على غرار الطلائع المشتقة من دماغ بشري آخذ بالتنامي، تبدي استجابة تكاثرية قوية للعامل FGF-2 [21]. بيد أنه لايمكن إثارة أي تأثيرات جمعية أو تآزرية على التكاثر بسبب EGF أو LIF. وتختلف هذه النتيجة عن المعطيات المتحصل عليها باستخدام الخلايا الأولية [20-18,14]. والتي يمكن أن توحي بأن الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES المتكاثرة إنما تمثل مرحلة أقل نضجاً من الخلايا الطليعية المشتقة من دماغ بشري جنيني مكتمل. وفي الواقع إن الدراسة على خلايا القوارض تشير إلى أن الخلايا الجذعية العصبية المعزولة أثناء التكوّن العصبي المبكر تعتمد في تكاثرها على FGF-2، وأن الاستجابة للعامل EGF لاتكتسب إلّا في المراحل المتأخرة من التمايز الخلوي للطلائع العصبية [26,25].

بعد الازدراع في دماغ فأر حديث الولادة، أصبحت الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES مندمجة في مناطق دماغية مختلفة، حيث تمايزت إلى عصبونات وخلايا دبقية. وربما يرجع الفشل في كشف خلايا ناضجة قليلة التغصن في الوسط الحي إلى قلة كفاءة التمايز الدبقي القليل التغصنات في الطلائع العصبية البشرية مقارنة بنظائرها في القوارض [22]. ومما يسترعي الانتباه أن العصبونات المشتقة من الخلايا المانحة لم تكن مقتصرة على مواقع تبدي تكوّناً عصبياً بعد ولادي، بل وجدت كذلك في مناطق أخرى عديدة من الدماغ. وقد تمّ الحصول على معطيات مشابهة في دراسات تضمنت ازدراع طلائع مشتقة من الجهاز العصبي المركزي البشري في الدماغ البالغ للقوارض [23]. إن قابلية ازدراع خلايا مانحة فردية خارج فترة التكوّن العصبي يمكن أن تشير إلى استخدام محتمل للطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES البشرية في الاستبدال الخلوي في الجهاز العصبي المركزي البالغ. ولابد من المزيد من الدراسات لتحديد ما إذا كانت الخلايا المندمجة تكتسب الخصائص النوعية للمنطقة التي تستقر فيها وتصبح نشيطة وظيفياً، وإلى أي مدى يحدث ذلك باستثناء الأكداس داخل البطينية المؤلفة من خلايا عصبية ظهارية ناضجة وغير ناضجة. لم يجرِ اكتشاف أي آفات تشغل حيزاً داخل الأدمغة المضيفة، والأهم من ذلك فإن أي تشكّل ورمي مسخي لم يلاحظ خلال الأسابيع الثمانية التي أعقبت زمن العملية الجراحية. وبينما تتضح ضرورة قيام دراسات أمان صارم على رئيسات غير بشرية قبل التفكير في إمكانية التطبيقات الطبية السريرية، فإن معطياتنا توحي بأن الطلائع العصبية المعزولة من مستنبتات خلايا جذعية جنينية بشرية آخذة بالتمايز إنما تمثل مصدراً صالحاً واعداً لصالح الإصلاح والترميم العصبي.

بروتوكول التجربة

أولا: استنبات الخلايا الجذعية الجنينية ES

لقد تمّ استنبات سلالات خلوية جذعية جنينية تحمل رمز H1 (انتقالات 16-33) وH9 (انتقالات 34-55) وسلالة نسيلية مشتقة من H9 وH9.2 (انتقالات 34-46) على طبقة مغذية من أورمات ليفية لجنين فأر مشعّع مع الحرص على التجديد اليومي للوسط المؤلف من DMEM/F12 وعلى استبدال 20% من المصل (السيروم) المؤلف من (Gibco ,Rockville,MD) و0.1 mM بيتا مير كابتو أيتانول β-mercaptoethanol، 2µg/ml هيبارين Heparin و FGF-2 4ng/m.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

أما النسيلة H9.2 فقد اشتُقّت من السلالة H9 عن طريق تلبيس خلايا فُرادى بالملاحظة المباشرة تحت عدسة المجهر في حجيرات مفردة. وقد كانت قدرتها على التجدد الذاتي والتمايز مماثلةً للسلالة H9 بعد المضاعفة 300 مرة تقريباً [4] ويشير تحليل النمط الظاهر إلى أن السلالات كانت مضاعفة الصيغة الصبغية في مراحل محددة.

ثانياً: مستنبتات تمايز الخلايا الجذعية الجنينية

حُضِنت المستنبتات الخلوية الجذعية الجنينية ES مع أنزيم الديسباز dispase (0.1- 0.2 mg/ml, Gibco) بدرجة حرارة 37°C لمدة 30 دقيقة، أبقت المستعمرات الخلوية الجذعية الجنينية سليمة ثم كوّرت هذه المستعمرات وأُعيد تعليقها في وسط خلوي جذعي جنيني خالٍ من العامل FGF-2، واستنبتت لمدة 4 أيام في دورق استنبات نسيجي مساحته 25 سم^2 مع الحرص على تجديد الوسط يومياً. وقد نمت هذه المستعمرات الخلوية الجذعية الجنينية ES كأجسام جنينية (EBs) عائمة بينما التصقت الخلايا المغذية الباقية بسطح القارورة. وأُزيلت الخلايا المغذية عن طريق نقل الأجسام الجنينية EBs إلى دورق جديد وبعدئذ جرى تلبيس الأجسام الجنينية هذه في دورق استنبات نسيجي مساحته 25سم^2 (Nuclon) في DMEM/F12، أضيف إليه الأنسولين (25µg/ml) وترانسفيرين (100µg/ml) وبروجيستيرون (20 nM) وبوتريسين (60 µM) وسيلينات الصوديوم (30 nM) وهيبارين (2µg/ml) وذلك بوجود العامل FGF-2(20 ng/ml) [14،15].

ثالثاً: عزل واستنبات الخلايا الطليعية العصبية

لقد جرى حضن الأجسام الجنينية الآخذة بالتمايز والمستنبتة لمدة 8-10 أيام مع أنزيم الديسباز (0.1 mg/ml) بدرجة 37°C لمدة 15-20 دقيقة من أجل فصل أكداس خلايا الوريدات عن الخلايا المسطحة المحيطة بها. وهنا انكمشت تكتلات الوريدات بينما بقيت الخلايا المسطحة المحيطة ملتصقة. وعند هذه النقطة أُزيحت هذه التكتلات الوريداتية بواسطة هز الدورق تاركةً الخلايا المسطحة ملتصقة. ثم جرى تكوير هذه التكتلات وتمّت بعثرتها بلطف في ماصّة 5 ml ثم تمّ تلبيسها في دورق استنبات لمدة 30 دقيقة لتتيح التصاق الخلايا الملوثة الفرادى وبعدئذ نقلت التكتلات الوريدية الطافية إلى دورق جديد مغلّف بالمركب poly-(2-hydroxyethyl - methacrylate) من أجل منع الارتباط. وبعدها استنبتت في وسط يستخدم للطلائع العصبية البشرية بوجود العامل FGF-2 (20 ng/ml). وقد كانت المستنبتات تنشطر 1:2 أو 1:4 كل أسبوعين عن طريق بعثرة الكرات العصبية إلى وحدات أصغر بماصّة باستور [14]. وباستخدام أنزيم التربيسين trypsin (0.025% في EDTA 0.1%) فُكّكت الأكداس الخلوية والخلايا المسطحة المتبقية والغضة ثم أُحصيت أعدادها من أجل التقييم الكمّي لكفاءة التمايز العصبي والعزل. وقد تمّ استخلاص النسبة المئوية للطلائع العصبية المفترضة (خلايا الوريدات) بين مجموع الخلايا المتمايزة من الخلايا الجذعية الجنينية ES بالاستناد إلى ثلاث تجارب مستقلة على السلالتين H9 وH9.2. ولغرض تحاليل الفعالية التمايزية للطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES، فقد جرى استنبات الخلايا على ركازة أورنتين/لامينين في وسط مؤلف من DMEM/F12 إضافةً إلى N2(Gibco) وcAMP(100ng/ml) وعامل مغذٍّ عصبي مشتق من الدماغ (BDNF, 10ng/ml, pepro Tech) في غياب العامل FGF-2. وقد تمّ استنبات الطلائع العصبية المشتقة من خلايا ES بإضافة DMEM مع N1(GIBCO) و PDGF-A(2ng/ml) حسبما وصف في [14] من أجل تعزيز تمايز الخلايا القليلة التغصنات. وفي أثناء مشوار التمايز في الزجاج، جرى إنجاز تحاليل مورفولوجية وتلوين مناعي بواسمات مخصّصة للأسلاف ولأكثر الخلايا العصبية نضجاً.

رابعاً: التلوين النسيجي الكيميائي والتلوين المناعي النسيجي الكيميائي

لغرض التحليل المورفولوجي للتشكلات الوريداتية جرى غسل المستنبتات ذات الوريدات بـ(PBS) ثم تثبيتها في بارافورم ألدهيد بتركيز 4% وغلوتار ألدهيد بتركيز 0.25% لمدة ساعة تمّ جرى طمرها في الراتنج البلاستيكي حسبما وصف [15]. وقد لُونت المقاطع ذات سماكة 1µm بأزرق التلوئيدين. أما التلوين النسيجي الكيميائي بالفوسفاتاز القلوية في مستنبتات الأجسام الجنينية EB المتمايزة وخلايا ES (كشاهد إيجابي) فقد تمّ باستخدام (صندوق تلوين فكتور الفسفتاز القلوي الأزرق الذي تصنعه مختبرات فكتور في بورلنكام بكاليفورنيا).

لغرض التلوين المناعي، جرى حضن مستنبتات سواترية مع مضاد النستين ومضاد الموساشي -1 ومضاد GFAP ومضاد GFAP البشري، و 04 ومضاد TH. وقد تمّ شراء أضداد β111- tubulin والخيط العصبي 68 (NF) والخيط العصبي 200 (NF) وMAP2ab (والغلوتامات) من شركة سيغما في سان لويس / بولاية مسيسبي. أما المستضدات فقد جرى إظهارها باستخدام الأضداد الثانوية المتفلورة المناسبة والموضحة في [14] و [15]. ولغرض تحليل اندماج الـ (BrdU)، فقد جرى حضن أربع مستنبتات سواترية من كل مجموعة في (2 مكرومول) من BrdU لمدة 16 ساعة. ثم جرى تثبيت المستنبتات في بارافورم ألدهيد بتركيز 4%، كما جرى مسخها denatured في حمض كلور الماء بتركيز واحد نظامي ثم تمّت عمليات الوسم المناعي والتعداد الخلوي. أما الشواهد السلبية الخالية من الأضداد الأولية فقد تمّ تضمينها في كل سلسلة من السلاسل.

خامساً: الازدراع داخل البطينات المخية والتحليل في الوسط الحي

لقد تمّ قطاف تجمعات الخلايا العصبية المشتقة من خلايا ES إما بعد العزل بواسطة الديسباز فوراً أو أثناء المقاطع الأربعة الأولى لتوسع عامل النمو ثم جرى تفكيكها بالتربسين (بتركيز 0.025% في EDTA بتركيز 0.1% وبدرجة حرارة 37°C لمدة 5-10 دقائق). ثم جرى تمريرها عبر مرشحة أقطار ثقوبها 70 مكرومتر وتعليقها في وسط L15(GIBCO) بتركيز 100 000 خلية قابلة للنمو لكل مكرولتر. وباستخدام الإضاءة من الأسفل إلى الأعلى تمّ حقن 2-3 مكرولتر من المعلّق الخلوي بشكل بطيء داخل كل من البطينات الجانبية لفئران حديثة الولادة مخدرة بالتبريد الشديد. وكان يجري الكبت المناعي للحيوانات المزدرعة عن طريق الحقن اليومي بسايكلوسبورين A (بمقدار 10 ملغ/كغ داخل البريتوان) . وكانت تجري تروية عبر قلبية للفئران بسائل رنغر متبوعة بسائل بارافورم ألدهيد (بتركيز 4%) محضر من PBS وذلك بعد أسبوع واحد وأسبوعين وأربعة أسابيع وثمانية أسابيع من الازدراع ومن ثم تمّ تشريح الأدمغة وتثبيتها لاحقاً بنفس المثبت بدرجة حرارة 4°C لحين الاستعمال. وتمّ تحديد هويّة الخلايا المانحة في مقاطع فيبراتومية إكليلية بسماكة 50 مكرومتر بواسطة

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

التهجين في الموقع وباستخدام مسبار موسوم بالديجوكسيجينين يخص عنصر التكرار alu البشري [24]. وبالتناوب، تمّ إخضاع المقاطع إلى مسترجع بموجة مكروية للمستضد (180W في 0.01M من داريء من السيترات pH6.0 لساعة واحدة) وحضنها مع ضد لمستضد نووي خاص بالبشر بوجود التريتون X-100 (Triton) بتركيز 0.1%، كما جرى وسم مضاعف للخلايا الإيجابية المناعة بأضداد لـ(GFAP). وقد تمّ كشف المستضدات بأضداد ثانوية مقترنة بحامل فلورة مناسب [24]. وتمّ فحص المقاطع بمجاهر ماسحة ليزرية (ليكا TCS Leica وزايس أكسيوسكوب Zeiss Axioskop). أما النوعية الدقيقة للواسمات الخلوية البشريّة فقد تمّ تأكيدها من خلال غياب الإشارة من الحيوانات الشاهدة غير المزدرعة. يضاف إلى ذلك أن حذف الضد الأول استخدم كشاهد سلبي.

المراجع REFERENCES

[1] Thomson, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282. 1145-1147 (1998)

[2] Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.F., Trounson, A. & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat. Biotechnol. 18, 399-404 (2000).

[3] Thomson, J.A. & Odorico, J.S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. Trends Biotechnol. 18, 53-57 (2000).

[4] Amit, M. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev. Biol. 227, 271-278(2000).

[5] Wiles, M.V & Keller, G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development 111, 259-267 (1991)

[6] Klug. M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y. & Field. L.J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, J. Clin. Invest, 98, 216-224 (1996)

[7] Soria, B. et al. Insulin -secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes 49, 157-162 (2000).

[8] Bain, G., Kitchens, D. Yao, M., Huettner, J.E. & Gottlieb, D.I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro, Dev. Biol. 168, 342-357 (1995).

[9] Okabe. S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro. A.C., Segal, M. & McKay, R.D.G. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech. Dev. 59, 89-102 (1996).

[10] Mujtaba. T. et al. Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. Dev. Biol. 214, 113-127 (1999)

[11] Brustle, O. et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science 285, 754-756 (1999).

[12] Brustle, O. et al, In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. Proc. Natl. Acad Sci. USA 94, 14809-14814 (1997).

[13] McDonald, J.W. et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat. Med, 5. 1410-1412 (1999).

[14] Zhang. S.C., Ge, B & Duncan, I.D. Tracing human oligodendroglial development in vitro. J. Neurosci. Res. 59, 421-429 (2000).

[15] Zhang, S.C., Ge, B. & Duncan, I.D. Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity, Proc. Natl. Acad. SCi. USA 96, 4089-4094 (1999).

[16] Lendahl, U., Zimmerman, L.B., & McKay. R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60, 585-595 (1990).

[17] Kaneko, Y. et al. Musashi 1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. Dev. Neurosci. 22, 139-153 (2000).

[18] Svendsen, C.N., clarke. D.J., Rosser. A.E. & Dunnett, S.B. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. Exp. Neurol. 137, 376-388 (1996).

[19] Carpenter, M.K. et al. In vitro expansion of a multipolent population of human neural progenitor cells. Exp. Neurol. 158, 265-278 (1999).

[20] Vescovi, A.L. et al. isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. Exp Neurol, 156, 71-83 (1999).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[21] Flax, J.D. et al. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. Nat. Biotechnol. 16, 1033-1039(1998).

[22] Svendsen, C.N., Calowell. M.A. & Ostenfeld, O. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. Brain Pathol. 9, 499-513 (1999).

[23] Fricker, R.A. et al. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. J. Neurosci. 19, 5990-6005 (1999).

[24] Brustle, O. et al. Chimeric brains generated by intraventricular transplantation with human brain cells into embryonic rats. Nat. Biotechnol. 16, 1040-1044 (1998).

[25] Kalyani. A.D., Hobson, K & Rao, M S. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization and clonal analysis. Dev. Biol. 186, 202-223(1997).

[26] Tropepe, V. et al, Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon, Dev. Biol. 208, 166-188 (1999).■

❐ ✦ ❐

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

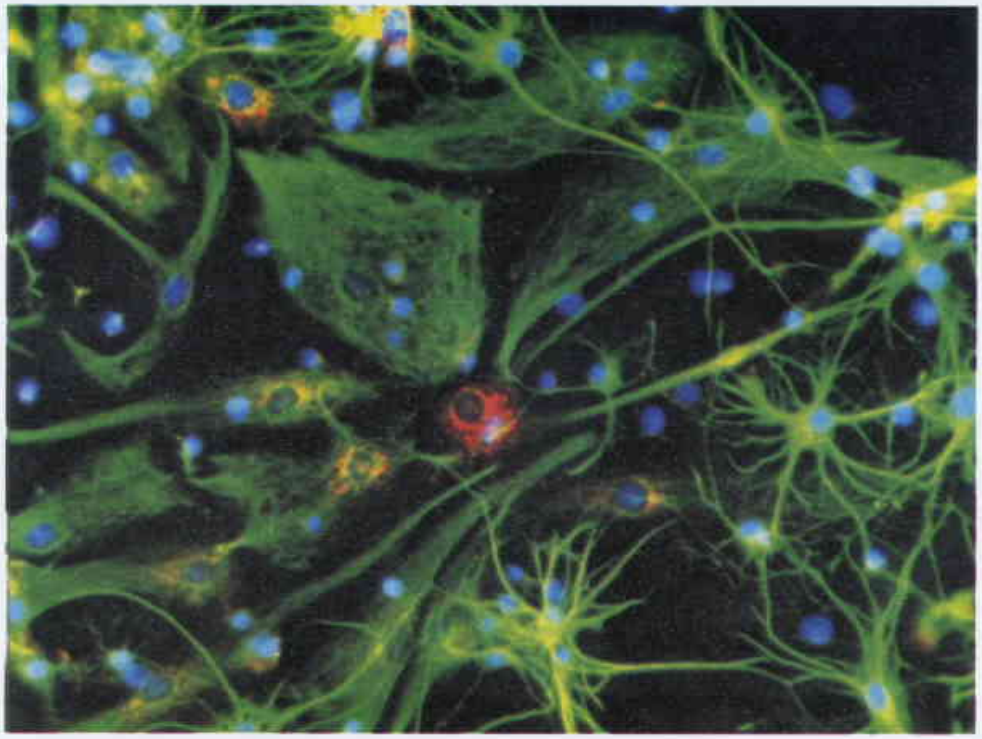
الخلايا النجمية: نجوم جديدة للدماغ*

فرانك فريفر
مركز الكيمياء العصبية في ستراسبورغ - فرنسة
سيلين شتاينمتز
طالبة تحضر أطروحة في العلوم العصبية ضمن فريق فرانك فريغر

ملخص

التخصص والتآزر بين الخلايا مبدآن أساسيان يحكمان انتظام عمل الكائنات الحية، وهما كثيراً ما يكونان مهملين عندما يتعلق الأمر بالدماغ، وبهذا الصدد فإن أيَّ طالب يدرس البيولوجيا أو الطب متفق مع القول بأن "العصبونات هي العناصر الفاعلة الأساسية في الدماغ"، ولكن ألا يُقلّل هذا من شأن وأهمية الخلايا الدبقية التي تملأ كل المكان الذي تتركه العصبونات شاغراً؟ والأكثر تعداداً من بين هذه الخلايا الدبقية هي الخلايا النجمية التي تحدث اختراقاً هاماً على المسرح العلمي منذ سنتين، فهي ولمدة مئة عام تقريباً كانت تعتبر نسجاً مالئة وبأحسن الأحوال مغذّية، ولكنها حالياً في صلب المجال المخصص للعصبونات: تطور المشابك العصبية ونشاطها.

الكلمات المفتاحية: خلايا نجمية، خلايا دبقية، عصبونات، دبق عصبي، مشابك عصبية، بطين دماغي.



خلايا نجمية الشكل في الدماغ، إنها خلايا نجمية astrocytes التي تظهر هنا تحت المجهر [illegible] في طبق مستنبت حيث تتجاور مع خلايا عصبية في طريقها [illegible].
اللون الأزرق يشير للنوى الخلوية.

الخلايا النجمية مدهشة كما أوضحت مجلة Nature (أيار 2002) بمقال نعرض له لاحقاً، والخلايا الدبقية مدهشة كذلك وقد تجاهلها علماء البيولوجيا العصبية، واعتبروها لوقت طويل مجرد منسّقة للعصبونات. نعم هذا صحيح لأنه بدونها لايكون وجود المشابك والعصبونات ممكناً.

في أبسط مثال (فريق كرة القدم سواء كنت لاعباً أم مدرباً أم مجرد متفرج) فإنك تعلم أن النجاح يعتمد اعتماداً كبيراً على عاملين أساسيين هما التخصص والتعاون. وعلى مستوى جسم الإنسان يتكرر الكلام، فمنذ أواسط القرن التاسع عشر كتب عالم الباثولوجيا الألماني رودولف فيرخو R. Virchow [1] : "يشبه الجسم البشري دولة حرة مكوّنة من

* نُشِر هذا المقال في مجلة *La Recherche*, N.361, Feb. 2003. ترجمة الدكتور غسان عليا - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

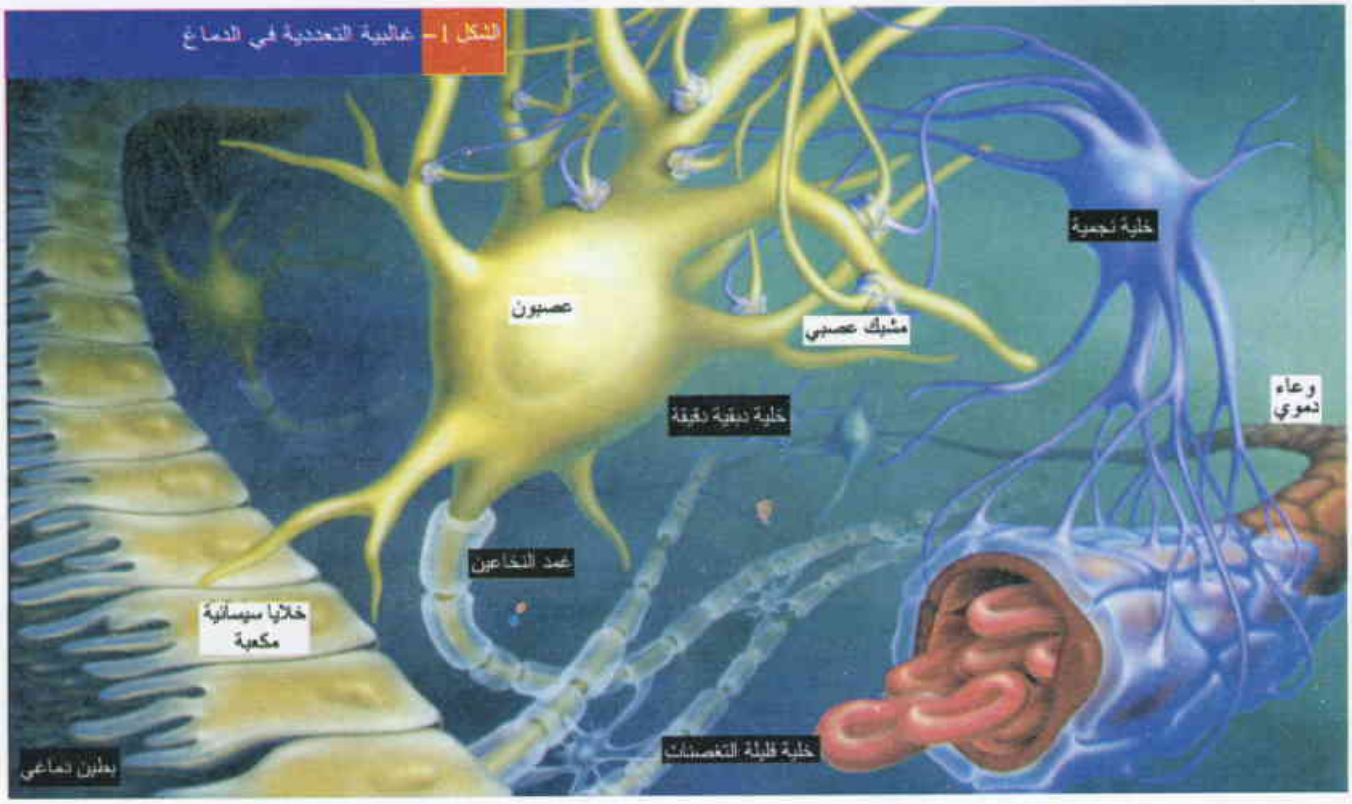
أفراد متساوين، أو اتحاداً فيدرالياً من الخلايا، أو دولة خلوية ديموقراطية، وحتى لو أن الخلايا التي تكوّن هذه الدولة ليس لها القدرات نفسها إلا أنها لاتملك الحقوق نفسها، وهذه الدولة تستمر وتبقى لأن أفرادها يعتمد بعضهم على بعض". وباقتراح هذا "المذهب الخلوي الثوري" فإن هذا العالِم يفرض نفسه كأحد مؤسسي البيولوجيا الحديثة، فهو نفسه الذي وصف لأول مرة عام 1856 النسيج الضام الذي يملأ الفضوات بين العصبونات. ولتمييزه فإنه أُطلق عليه مصطلح "دبق عصبي neuroglie". وأدبياً فإن "glue" تعني مادة لاصقة، وبعده أظهر العديد من البيولوجيين أن هذا الدبق العصبي مكوّن من عدة أنماط خلوية. وسمحت تقنيات التلوين التي منحت كاميلو غولجي C. Golgi ورامون كاجال R. Cajal جائزة نوبل عام 1906 بتمييزها مورفولوجياً إلى: خلايا نجمية astrocytes، وخلايا دبق عصبي قليلة التغصنات oligodendrocytes، وخلايا دبقية دقيقة microgliales، وخلايا سيسائية جوفية ependymaires تتمّم الرباعية الدبقية (الشكل 1). وإذا كان للأنماط الخلوية الثلاثة الأخيرة وظائف معروفة نسبياً فهذا لاينطبق على الخلايا النجمية، واعتبارها خلايا مالئة كان لوقت طويل صفة ملازمة لها وكانت بعيدة تماماً عن الدور البارز للعصبونات.

في الحقيقة تحيط الخلايا النجمية كل أجزاء العصبونات المجرّدة من النخاعين (الميلين Myeline) وهذا أعطى المجال لفرضيتين منذ القرن التاسع عشر حول وظائف الخلايا النجمية:

- أولاهما أن الخلايا النجمية قادرة على تغذية العصبونات التي هي في الواقع مستهلكة كثيراً للطاقة، وليس لها اتصال مباشر مع المواد المغذّية المحمولة والمنقولة بالدم. وتكون الخلايا النجمية بتماس مباشر مع الشعيرات الدموية وتلعب دور الوسيط بينها وبين العصبونات.

- بالتوازي مع هذه الوظيفة المغذّية فالخلايا النجمية تؤمّن على مايبدو وظيفة التنظيف والتنقية وتنظّم تركيب السوائل بين الخلوية التي تسبح فيها العصبونات. وهذا الدور جدير بالاهتمام طالما أن تنظيم وتثبيت تراكيز أيونات الكالسيوم والبوتاسيوم أساسي جداً من أجل قابلية التنبيه والاستثارة excitabilit التي تملكها العصبونات.

رسخت هاتان الفرضيتان في الذاكرة مع العلم أنهما لم تُوضّحا توضيحاً جلياً في الحي in vivo وجعلتا الخلايا النجمية مشرفةً على العصبونات. فهل تستطيع هذه الخلايا النجمية أن تتطاول على المزايا التي هي محض عصبونية وأن تلعب دوراً في النقل المشبكي transmission synaptique للإشارات العصبية؟



تتميز الخلايا النجمية الأكثر عدداً من العصبونات باستطالات وتفرعات طويلة تحيط نهاياتها بالمشابك العصبية من جهة وبالشعيرات الدموية من جهة أخرى. وتتجاور هذه الخلايا النجمية مع الخلايا قليلة التغصنات التي تكون استطالاتها أقل غزارة وتشكل غمد النخاعين gaine de myeline الذي يحيط بالألياف العصبية. يحمي غمد النخاعين العازل من انقطاع النقل العصبي و يسرّع على الأخص انتقال وانتشار الإشارات العصبية على طول العصبونات، أما الخلايا الدبقية الدقيقة فهي أصغر حجماً وفقيرة بالاستطالات وتكوّن الجملة المناعية الدماغية. وتضم العائلة الدبقية أيضاً الخلايا السيسائية مكعبة الشكل التي تبطّن البطينات الدماغية*.

* Ventricules cérébraux البطينات الدماغية: تجاويف دماغية يملؤها سائل دماغي céphalo-rachidien.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

رقابة متعددة

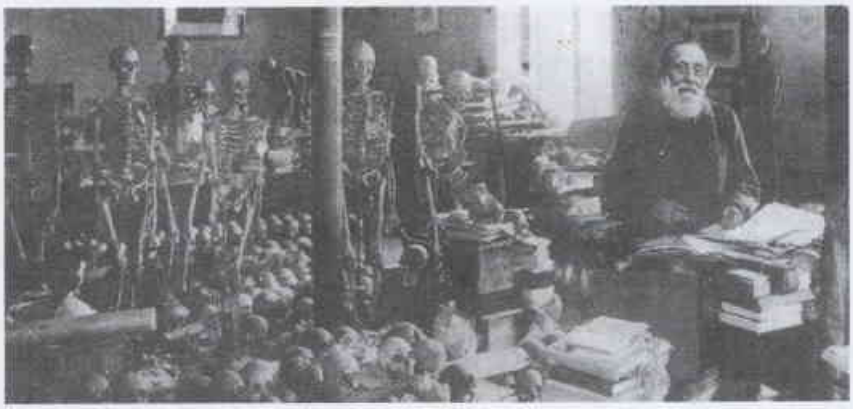
إذا نظرنا بدقة إلى المشابك العصبية يتضح لنا أن معظمها محاط باستطالات خلوية نجمية أعطت الخلايا التي تحملها اسمها (خلايا نجمية)، ومن هنا ظهرت فرضية منذ السبعينيات من القرن الماضي تقول بأن الخلايا النجمية تمتص بعض النواقل العصبية، (وعلى الأخص الغلوتامات glutamate) مُقلّلة بذلك من تأثيرها. وبعد ذلك بقرابة 30 عاماً أوضح وأقام الدليل على ذلك ستيفان أوليه S. Oliet ومساعدوه في جامعة بوردو [3] حيث اعتمدوا لهذا الغرض على ظاهرة تصادف في منطقة تحت المهاد hypothalamus * عند أنثى الجرذان؛ فخلال فترة الإرضاع تتراجع الاستطالات المميزة للخلايا النجمية وتبتعد عن المشابك العصبية. ويجعل هذا "التعرّي" دراسة تأثير الخلايا النجمية على النقل العصبي في الحي ممكناً، حيث يترافق ذلك في هذه الحالة مع تحرّر أقل للغلوتامات في الشق المشبكي وفعالية أقل للمشابك العصبية. تبدو هذه الملاحظة مدهشة؛ فإذا افترضنا أن الخلايا النجمية تمتص النواقل العصبية فإن تراجعها سيحرّض تحريضاً منطقياً على تراكم هذه النواقل العصبية لا على تناقصها. وقد أظهر هؤلاء الباحثون من جامعة بوردو أن هذا صحيح في الوهلة الأولى حيث تتجمع النواقل العصبية في الفضاء المشبكي، وتنشّط التراكيز العالية وتفعّل المستقبلات الموجودة على سطح العصبون قبل المشبكي pre -synaptique وتثبّط لاحقاً تحرير الغلوتامات من حويصلات الغلوتامات في المشبك العصبي وبذلك فإن النظرية القديمة تمّ أخيراً إثباتها.

ولكن هناك طريقتان للإشراف مختلفتان تماماً تمّ التأكد منهما مؤخراً وسّعتا من طيف العمل الذي تستأثر به الخلايا النجمية (الشكل 2). ففي عام 2001 اكتشف أوغست سميت A. Smit وزملاؤه الذين يعملون على عصبونات الحلزون في جامعة أمستردام، أن الخلايا الدبقية تستطيع أن تحرر أفخاخاً تحتبس النواقل العصبية مما يخفّف من النقل المشبكي للإشارة العصبية [4]. وفي عام 2002 أوضح فريق روبرت مالينكا R. Malenka في جامعة ستانفورد بكاليفورنيا أن الخلايا النجمية تستطيع أن تنظّم كمياً مستقبلات النواقل العصبية على سطح العصبونات بعد المشبكية. ويقتضي ذلك أن الخلايا النجمية ترسل إشارات إلى هذه العصبونات، وحسب هؤلاء الباحثين من كاليفورنيا الذين عملوا على أعصاب من الحصين الدماغي hippocampe ** عند الجرذ فإن الأمر يتعلق بالعامل TNFα (Tumour necrosing factors α) وهو أحد السيتوكينات cytokines *** الذي من المعلوم أنه يُفرَز من قبل الخلايا النجمية والعصبونات وأنماط خلوية أخرى دون أن يكون من المتخيل أبداً أن تنسب له هذه الوظيفة. وعموماً تشير هذه النتائج الجديدة إلى أن الخلايا النجمية ضرورية للنقل العصبي المشبكي (الشكل 2). ولكن هل يجب أن نستخدم مصطلح "المشبك ثلاثي الأجزاء" كما استخدمه البعض؟ وفي الحقيقة نظن أنه من المفضّل الحذر. وبدلاً من أن نختار الخلايا النجمية كجزء مستقل تماماً عن المشابك العصبية، يكون من الأفضل حالياً تعميق معارفنا عن وظائف هذه الخلايا.

ومن جانبنا فإننا كشفنا النقاب عن أن الخلايا النجمية لاتكتفي بالتأثير على فعالية المشابك الموجودة فقط ولكنها ضرورية من أجل تشكيل مشابك عديدة وفعّالة. ويبدو أن طبيعة العامل الذي يتدخل (أو على الأقل العوامل التي تمّ تحديدها ليومنا هذا) ليست أقل من اكتشاف مدهش.

- وكما جرت العادة، يبدأ الموضوع بتقدم أو تطور تقني تكنولوجي. فمنذ ثماني سنوات طور بِن بارس B. Barres وفريقه في جامعة ستانفورد طريقة سمحت بفصل كلي للعصبونات عن الخلايا الدبقية والمحافظة عليها بالاستنبات لعدة أسابيع، ودراسة أثر الخلايا الدبقية على تطورها ووظائفها. وكشفت التجارب التي أجراها فرانك فريغر F. Pfrieger الذي كان باحثاً في المخبر الأمريكي (كاليفورنيا) عن بعض الملاحظات غير المتوقعة. فعندما تستنبت العصبونات (حالة عصبونات شبكية neurones retiniens من الجرذ) بغياب الخلايا الدبقية، تكون الإشارات المتولّدة على مستوى المشابك العصبية ضعيفة جداً، ولكن يزداد تواترها وشداتها بوجود الخلايا النجمية. إضافة إلى ذلك،لا يعتمد تأثير هذه الخلايا الدبقية على التماس الفيزيائي مع العصبونات؛ إنما ينشأ هذا التأثير من تحرير مادة أو عدة عوامل من الخلايا الدبقية في وسط الاستنبات [6].

أما الخطوة التالية فكانت مخططة تماماً؛ وهي تمييز طبيعة هذا العامل الغامض وآلية عمله. ففي عام 2001، وبشكلٍ مستقل، أظهر فريقا بِن بارس بالولايات المتحدة الأمريكية وفرانك فريغر في أوربا أن هذا العامل المتحرر من الخلايا النجمية يعمل على



يُعد رودولف فيرخو، من أحد الآباء المؤسسين لعلم البيولوجيا الحديث. وقد أُخذت له صورة في مكتب عمله عام 1896. إنه العالِم الذي كتب للمرة الأولى في علم الأعصاب، وهو عالِم بارز في علم الأمراض، وكان أيضاً منخرطاً في الحياة السياسية الألمانية ومعارضاً مقنعاً لـ أوتو فون بسمارك.

★ Hypothalamus تحت المهاد: منطقة في الدماغ تحت السرير البصري تمارس دوراً رقابياً على الغدة النخامية وتنظّم بعض فعاليات الجملة العصبية الإعاشية.
★★ Hippocampe الحصين الدماغي: بنية في قشرة الدماغ تتوضع على الوجه الداخلي من الفصّ الصدغي الذي يتدخل في بعض أشكال الذاكرة.
★★★ Cytokines السيتوكينات: صنفٌ من البروتينات المنحلّة أو الغشائية التي تتدخل في الاتصال بين الخلوي.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

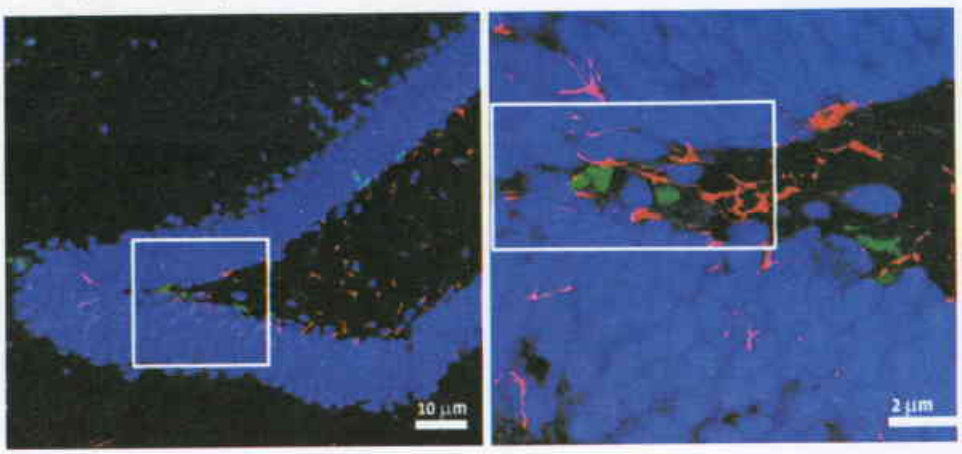
الشكل 2- المشابك الخاضعة للتأثير

تظهر مقدرة الخلايا النجمية على تعديل نقل الإشارة العصبية في عدة أوجه (موضحة بهذا الشكل بطريقة عامة مع أن التجارب أجريت على عصبونات وناقل عصبية مختلفة). تعدّل الخلايا النجمية من كمية جزيئات الناقل العصبية الموجودة في المشابك العصبية بامتصاصها أو إعادة تدويرها [1]. يعطل تراجع الخلايا النجمية هذه الآلية ويثبّط بالمحصلة تحرير الحويصلات المشبكية بعد تثبيت الناقل العصبي على غشاء العصبون بعد المشبكي [2]. الخلايا النجمية قادرة أيضاً على تحرير جزيء فخ molecule-leurre كاستجابة للوسيط العصبي وهذا الجزيء يحتبس الوسيط العصبي المحرّر [3]. أخيراً تستطيع الخلايا النجمية تعديل كمية مستقبلات الوسائط العصبية على سطح العصبون بعد المشبكي عن طريق تحرير جزيئات محددة لنقل الإشارة [4].

زيادة عدد المشابك العصبية وعلى زيادة فعاليتها [8,7]. وبخصوص تحديد طبيعة هذا العامل فإن ذلك كان يشبه "المهمة المستحيلة" وتاريخ البحث في البيولوجيا يفيض بمثل هذه القضايا التي كانت غير مثمرة طيلة سنوات. وعلى الرغم من كل شيء فقد نشرنا طبيعة وهوية هذا العامل في تشرين الثاني عام 2001 [9] وأوضحت أولى تجاربنا أن تشكيل المشابك العصبية يعتمد على معقّد جزيئي من الحجم الكبير يحتوي على جزيء معروف تماماً (من حيث علاقته مع مرض العته الزهايمر Alzheimer) وهو ApoE أو الأبوليبوبروتين E(apolipoproteine E)، وقد تمّ سابقاً إيضاح أن هذا الجزيء تنتجه الخلايا النجمية ويبدو أنه مرشح لدور العامل الدبقي، ولكن أوضحت التجارب اللاحقة التي استخدم فيها الأبوليبوبروتين E الصنعي أن هذا الجزيء ليس له أي أثر في التشكّل المشبكي. وبما أن هذا الجزيء (ApoE) هو جزء من البروتينات الدهنية lipoproteines المعروف أنها ناقلة للكولسترول فقد اختبرنا مقدرة الكولسترول على تحريض تشكّل المشابك العصبية.

ولادة العصبونات

وفجأة، كان تقريباً مخيباً للآمال اكتشاف جزيء معروف منذ عام 1815 سماها الكيميائي مايكل يوجين شيفرول M. E. Chevreul في تلك الفترة بالكولسترين cholesterine، ولكن حيبة الأمل هذه تمّ تجاوزها سريعاً. فالنتائج عدا أنها أعطت أخيراً دوراً للبروتينات الدهنية المتحررة من الخلايا النجمية فإنها أوضحت أنها تتميز باستخدامات كامنة أساسية عديدة. فإذا كانت الخلايا النجمية تمد العصبونات بالكولسترول فهذا يعيد التساؤل عن الفرضية السابقة التي مفادها أن العصبونات تستطيع أن تنتج منه الكفاية من أجل استخداماتها الخاصة، (فالكولسترول مكوّن أساسي في



في دماغ الجرذان الفتية التي عمرها ثلاثة أشهر تظهر بوصوح الخلايا المتكاثرة (بالأخضر) في مستوى التلافيف المسننة للحصين الدماغي حيث تظهر العصبونات زرقاء وهي على تماس مباشر وحميم مع الخلايا النجمية (بالأحمر) وقد أظهر فرد غيج F. Gage وفريقه في معهد سالك بالحي أن الخلايا النجمية تنشّط تمايز هذه الخلايا الطليعية إلى عصبونات.

فرضيات:

الخلايا النجمية مفتاح التصوير الدماغي؟

ليست العصبونات الوحيدة المتميزة بامتلاك مستقبلات النواقل العصبية المختلفة على أغشيتها الخلوية. فالخلايا النجمية أيضاً تتمتع بالمواصفات نفسها، حيث تحرض النواقل العصبية على حدوث تبدلات داخل خلوية، على سبيل المثال ارتفاع تركيز الكالسيوم. ويمكن لهذا النمط من الإشارات الخلوية أن يساهم في حل لغز قديم يتعلق بالرابط بين الوظيفة العصبية والاستقلاب الدماغي. تعتمد تقنيات التصوير، كالتصوير بالتجاوب المغنطيسي الوظيفي أو التصوير المقطعي بالإصدار البوزتروني (pet-scan، الصورة) المستخدمة استخداماً متزايداً بالأبحاث الأساسية والتطبيق السريري، على مبدأ يشير إلى أن ازدياد معدّل التصبيب الدموي الدماغي (معدّل التروية الدماغية) ومعدّل استهلاك الأكسجين ومعدّل الغلوكوز الممتص في منطقة محددة من الدماغ يحدد ويشير إلى زيادة في نشاط العصبونات في هذه المنطقة [1]. ومع ذلك فإن آليات ربط الفعالية الدماغية بالتصبيب الدموي تبقى لغزاً، فهل تكون الخلايا النجمية الحلقة الناقصة؟ نملك الآن بعض الأدلة التي تشير إلى أن الغلوتامات، وهو ناقل عصبي مستخدم في معظم المشابك العصبية، يزيد من امتصاص الغلوكوز من قبل الخلايا النجمية واستخدامه الاستقلابي [2].

ويفترض هذا الكشف المهمّ أن الخلايا النجمية تعمل كوسيط بين تبدلات الفعالية المشبكية وتبدلات معدّل الأكسجين والغلوكوز. وتحتاج هذه الفرضية فعلاً إلى تأكيد، ولكن النتائج الحديثة من فريق الباحث الإيطالي جيورجيو كارميجنوتو G. Carmignoto تؤيد هذه الفرضية، وقد نشر هؤلاء الباحثون مؤخراً برهاناً تجريبياً مباشراً عن تعديل التصبيب الدموي بالخلايا النجمية [3].

[1] N.K. Logothetis et al., 412, 150, 2001; Olivier Blond, "L'imagerie cerebrale a cour ouvert", La Recherche, decembre 2001.

[2] P.J. Magistretti et L. Pellerin, Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci., 354, 1155, 1999.

[3] M. Zonta et al., Nat. Neurosci., 6, 43, 2003.

الأغشية الخلوية). ومن هنا برزت فرضيات جديدة متعلقة بدور الكولسترول في تطور المشابك العصبية [10]. فعلى سبيل المثال، من الممكن أن ترتبط قدرات العصبونات على اصطناع الحويصلات المشبكية (وبالتالي المشابك) بكمية الكولسترول الموجودة في هذه العصبونات. وأكثر من ذلك تقدم نتائجنا دليلاً إضافياً على العلاقة بين الكولسترول ومرض الزهايمر. فالحقيقة الراسخة بأن طفرة نوعية محددة في مورثة الأبوليبوبروتين E تزيد من خطر الإصابة بالنمط المتأخر من مرض الزهايمر توحي بأن هذه الطفرة تعيق بشكل أو بآخر مقدرة الخلايا النجمية على إمداد وتزويد العصبونات بالكولسترول عن طريق البروتينات الدهنية. وربما من الواجب أن نأخذ بالاعتبار الخلايا النجمية عند القيام بأعمال تهدف لتحديد الآليات المسؤولة عن هذا المرض.

هذه الخلايا النجمية هي إذاً حاثّات للمشابك العصبية وربما كانت أكثر من ذلك. فخلال تطور الدماغ يجب أن تتولد كمية معينة من العصبونات والخلايا الدبقية وتهاجر ضمن الدماغ بطريقة ملائمة. فمعظم الكتب الدراسية تعلّمنا أن العصبونات تنحدر من طلائع متميزة عن الخلايا الدبقية، وتهاجر إلى هذه المنطقة أو تلك من الدماغ على طول شبكة المسارات المكوّنة من الخلايا الدبقية الخاصة المسماة بالخلايا الشعاعية radiales. وعندما تستقر العصبونات في مكانها، من المفترض أن تتمايز هذه الأخيرة إلى خلايا نجمية. وإن هذا المخطط الذي تمّ وضعه بالإجمال في السبعينيات هو عموماً المرجح في أيامنا هذه. ولكن منذ عام 2000 قُلب هذا المبدأ رأساً على عقب بدراستين أجريتا على خلايا من الجرذ في الزجاج in vitro وفي الحي in vivo [12,11]. وتمخضت نتائج الدراسات عن فرضية جديدة؛ فخلال التطور الجنيني المبكر تُولّد الخلايا الشعاعية العصبونات، ومن ثمّ تولّد لاحقاً الخلايا النجمية. وتفترض هذه الدراسات أيضاً أن الخلايا الشعاعية تبقى عند البالغ وتكوّن الخلايا الجذعية للعصبونات. إضافة إلى ذلك بيّن فريق فرد غيج F. Gage (معهد سالك- كاليفورنيا) عام 2002 وجود عامل منحلّ تنتجه الخلايا النجمية يحث على تكاثر الطلائع العصبية وتمايزها إلى عصبونات في إحدى مناطق الدماغ (الحصين الدماغي)، حيث يستمر التشكّل العصبي حتى سن البلوغ [13]. وتشير هذه النتائج مجتمعة إلى أن الخلايا الدبقية تؤثر تأثيراً أكبر مما يتوقعه المرء على التطور الدماغي؛ وهي تشرف على مايبدو على معدّل توليد العصبونات سواء باعتبارها طلائع لها أو بتحرير عوامل منشطة حاثّة على التشكّل العصبي.

وشيئاً فشيئاً يصل بنا الأمر إلى اعتبار الخلايا النجمية أكثر من نسيج مالئ، فهي تشرف على توليد العصبونات، وإن علاقاتها مع المشابك العصبية أساسية لتطور نظام عمل الاتصالات بين العصبونات. ولكن

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

معلوماتنا بهذا الشأن مازالت في بداياتها. ومن أجل إحراز تقدّم أكبر فإن على "علماء الدبق العصبي" قبل كل شيء أن يتجاوزوا حاجزين تقنيين: تحديد تحت أنماط خلايا نجمية متوقعة والتي لها بعض الخصائص المتباينة أو المختلفة من منطقة لأخرى في الدماغ من جهة، ومن جهة أخرى وضع نماذج دراسة جديدة تسمح بدراسة دور الخلايا النجمية في الحي. ولكن مهما اكتشفنا فإنه واضح من الآن أن الخلايا النجمية لا يمكن أن تبقى مهملة، سواء في إطار اهتمامنا بتطور الدماغ وانتظام عمله أو الآليات الترميمية فيه (انظر المقال التالي).

المراجع REFERENCES

[1] www.pathguy.com /lectures/ virchow.htm.

[2] R. Virchow, Gesammelte Abhandlungen Zur wissenschaftlichen Medizin, Hamm, Frankfurt-am-Main, 1856.

[3] S.H. Oliet et al., Science, 292, 923, 2001.

[4] A.B. Smit et al., Nature, 411, 261, 2001; C. Klingler, " Un cristal riche d'enseignements", La Recherche, novembre 2001.

[5] E.C. Beattie et al., Science, 295, 2282, 2002.

[6] F.W. Pfrieger et B.A. Barres, Science, 277, 1684, 1997.

[7] E.M. Ullian et al., Science, 291, 657, 2001.

[8] K. Nagler et al., j. Physiol., 533, 665, 2001.

[9] D.H. Mauch et al., Science, 294, 1354, 2001.

[10] F.W. Pfrieger, Biochim. Biophys. Acta, sous presse, 2003; F.W. pfrieger, Bioessays, sous presse, 2003.

[11] P. Malatesta et al., Development, 127, 5253, 2000.

[12] S.C. Noctor et al., Nature, 409, 714, 2001.

[13] H. Song et al., Nature, 417, 39, 2002.■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

خلايا الدبق العصبي النجمية تحرّض على تكوين العصبونات من الخلايا الجذعية العصبية البالغة*

هونغجون سونغ، فريد. هـ. غاج
مختبر علم الوراثة - معهد سالك - كاليفورنية - الولايات المتحدة الأمريكية
شارل. ف. ستيفنس
مختبر البيولوجيا العصبية الجزيئية - معهد سالك - كاليفورنية - الولايات المتحدة الأمريكية

ملخص

اتضح لنا من خلال تقصّي الآليات التي يلعب الوسط المحيط المحلي من خلالها دوراً في ضبط التخصص المصيري للخلايا الجذعية العصبية البالغة، أن الخلايا النجمية astrocytes البالغة في منطقة الحصين الدماغي hippocampus قادرة على تنظيم تكوين العصبونات عن طريق توجيه الخلايا الجذعية كي تعتمد مصيراً عصبونياً نهائياً. ولم يكن هذا الدور في التخصص المصيري متوقعاً لأن العصبونات تتولد أثناء التطوّر الجنيني قبل معظم الخلايا النجمية. تعزز نتائجنا، بالإضافة إلى التقارير الحديثة حول دور الخلايا النجمية بتنظيم تشكّل المشبك العصبي والنقل المشبكي، النظرة المستجدة عن الدور التنظيمي الفعّال للخلايا النجمية أكثر من الأدوار الداعمة التقليدية التي تنسب إليها في الجملة العصبية المركزية تامة النمو.

الكلمات المفتاحية: الجملة العصبية المركزية، خلايا الدبق العصبي النجمية، التكوّن العصبي، الحصين الدماغي، الخلايا النجمية.

تتولّد خلايا جديدة في بوتقة الجملة العصبية المركزية CNS في سن النضج عند كل الثدييات بما في ذلك الإنسان [1-4]. وتحصل عملية التكوّن العصبي عند البالغ فقط في منطقتين متخصصتين: المنطقة تحت البطينية subventricular والمنطقة تحت الحبيبية في الحصين الدماغي [1-4]. أما خارج هاتين المنطقتين فإن الخلايا المتكاثرة تعطي دبقاً عصبياً لا عصبونات في الجملة العصبية المركزية البالغة السليمة [2،4-7]. وعلى عكس ما يمكن أن يتوقعه المرء، فإن الخلايا المتكاثرة المعزولة من عدة مناطق في دماغ البالغ [8-14]، بما في ذلك المناطق غير المكوّنة للعصب، يمكن أن تعطي عصبونات إما في الزجاج in vitro [8-14] أو بعد إعادة تطعيمها إلى مناطق مكوّنة للعصب في الحي in vivo [15، 16] وتقود هذه الاكتشافات إلى نشوء نظرة جديدة تقول إن الخلايا الجذعية العصبية يمكن أن تكون متوزعة توزعاً واسعاً في الجملة العصبية المركزية البالغة وأن مُشعرات الوسط المحيط المحلي تملي عليها خيارها المصيري. إن معرفتنا الحالية قليلة حول الآليات التي تتدخل في التخصص المصيري للخلايا الجذعية العصبية البالغة.

وفي هذه الدراسة، استفدنا من مزايا طرائق الاستنبات الخلوي من أجل تقصّي إسهامات الأنماط الخلوية المختلفة في التخصص المصيري للخلايا الجذعية المأخوذة من الحصين الدماغي البالغ اعتمادية عامل نمو الأرومة الليفية -2 (FGF-2). وأوضحنا أن الخلايا النجمية الناضجة المأخوذة من الحصين الدماغي بعد الولادة تحرّض على التكوّن العصبي في حين أن العصبونات تزيد من تكوّن الخلايا قليلة التغصنات من هذه الخلايا الجذعية البالغة نفسها. وبمقاربة كمية، أظهرنا أن الخلايا النجمية من الحصين الدماغي تنظّم تنظيماً فعّالاً التشكّل العصبي عند البالغ عن طريق تحديد المصير العصبي وتنشيط وتعزيز تكاثر الخلايا الجذعية العصبية البالغة. إضافة إلى أن تأثيرات الخلايا النجمية تكون متخصصة حسب المنطقة؛ فالخلايا النجمية من الحصين الدماغي البالغ تحتفظ بمقدرتها الكامنة على تحريض التشكّل العصبي، بينما لاتملك الخلايا النجمية من النخاع الشوكي البالغ هذه المقدرة. وليس اكتشاف الأدوار الفعّالة لخلايا الدبق العصبي النجمية في التشكّل العصبي متوقعاً، ويزيد من إمكانية إنتاج عصبونات في الدماغ عند البالغ التي تكون منظّمة على الأقل وفق الخصائص الموقعية والناحية للخلايا النجمية.

تمايز الخلايا الجذعية البالغة

بغية وسم ذُرّية الخلايا الجذعية، خمجنا الأنسال المتحدرة عن الخلايا الجذعية العصبية والمعزولة من حصين دماغ جرذ بالغ بفيروس قهقري مهندس وراثياً بحيث ينتج بروتين متفلور باللون الأخضر Green Fluorescence Protein (GFP) ثمّ انتخبنا الخلايا المعبرة عن نتاج الفيروس (GFP^+) لهذه الدراسة [10، 17]. تحتفظ هذه الخلايا البالغة المعتمدة على عامل نمو الأرومة الليفية -2، (FGF 2- dependent) والمعبرة عن نتاج الفيروس (GFP^+) بخصائصها كخلايا جذعية فهي أولاً: تستطيع أن تعطي الأنماط الخلوية الثلاثة الأساسية في الجملة العصبية المركزية، كما حددها استعمال الواسمات النوعية الخاصة بالأنماط الخلوية للعصبونات ($Tuj1^+$, $MAP2ab^+$)، والخلايا قليلة التغصنات

* نُشير هذا المقال في مجلة *Naturc*, Vol.416, 2 May 2002. ترجمة الدكتور غسّان علبا - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

oligodendrocytes (GalC+, RIP+) والخلايا النجمية (GFAP+) سواء في الزجاج [10، 17] (الشكل 1) أو في الحي بعد إعادة تطعيم الحصين الدماغي البالغ بها [15].

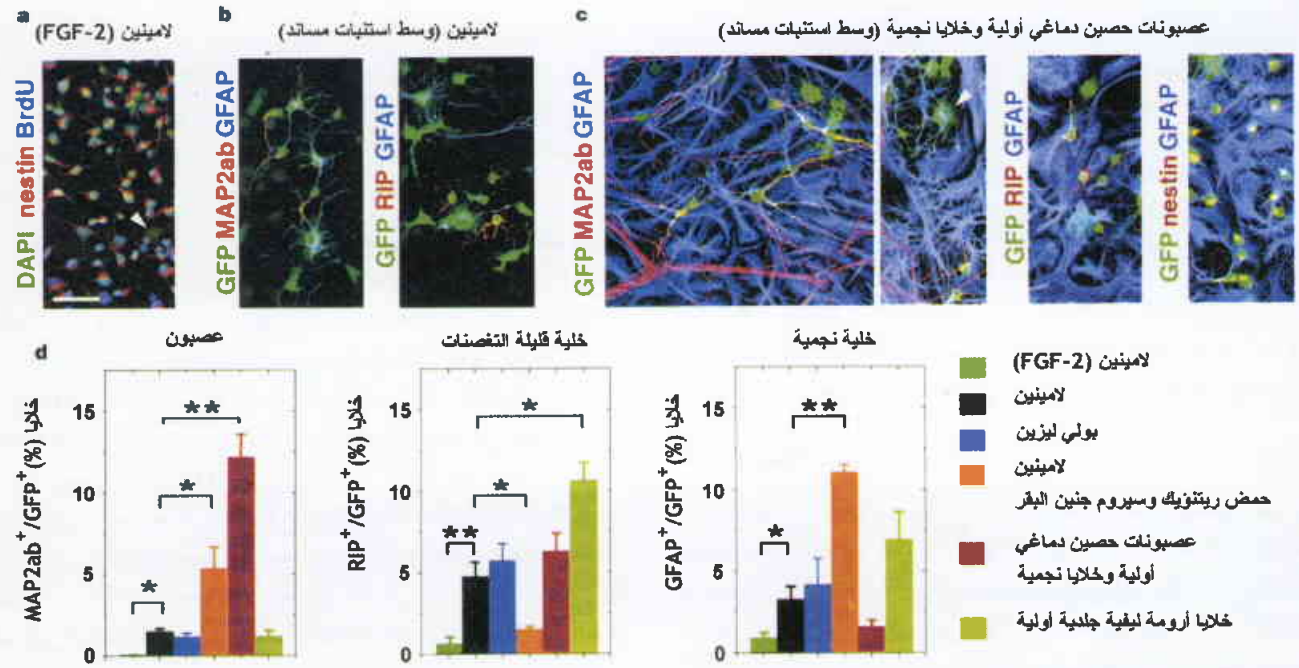
ثانياً: تتكاثر معظم هذه الخلايا تكاثراً نشيطاً بوجود FGF-2 بتركيز 20ng.ml-1 كما أظهره انجبال البرومودي أوكسي يوريدين bromodeoxyuridine incorporation (BrdU) خلال فترة حضن 36 ساعة (97.9±0.6%, n=3، الشكل 1a).

ثالثاً: تكون هذه الخلايا الجذعية البالغة موجبة النستين (99.3±0.2%, n=3، الشكل 1a) [18]، وهو واسم للخلايا غير الناضجة، ولكنها سالبة لواسمات العديد من الأنماط الخلوية المتمايزة الأخرى (الشكل 1d).

تبدو هذه الخلايا الجذعية البالغة، على خلاف بعض الخلايا الجذعية العصبية المعزولة من دماغ متطور [19]، بحاجة إلى عوامل خارجية المنشأ لتحرض على المآل النهائي والمصيري لسلالة خلوية عصبية في شروطنا التجريبية. وهذه النتيجة مبنية على ملاحظة كون الخلايا الجذعية العصبية البالغة تتمايز نادراً تمايزاً تلقائياً إلى عصبونات كما أظهره التعبير عن MAP2ab، وبشكلٍ غير متواتر فقط، تتمايز هذه الخلايا الجذعية إلى خلايا قليلة التغصنات (RIP+) أو خلايا نجمية (GFAP+) عندما تزرع بكثافة قليلة في وسط استنبات محدد خالٍ من السيروم وFGF-2 (الشكل 1b, d). وفي وقت سابق اتضح أن لحمض الريتنوئيك retinoic acid (0.5μM) وسيروم جنين البقر (FBS, 0.5%) قدرة محدودة على تحريض تمايز هذه الخلايا الجذعية العصبية البالغة (الشكل 1d) [17].

وبغية تحديد دقيق لإسهامات الأنماط الخلوية المختلفة في اختيار مصير الخلايا المتحدرة عن الخلايا الجذعية البالغة، استنبتنا خلايا جذعية بالغة تعتمد على FGF-2 ومعبرة عن البروتين المتفلور بالأخضر GFP+ على طبقة مغذّية من عصبونات أولية وخلايا نجمية مأخوذة من حصين دماغي حديث الولادة وذلك في وسط استنبات محدد خالٍ من السيروم. ووجدنا بعد الأيام الستة من الاستنبات المساند أن الخلايا الجذعية البالغة المعبرة عن البروتين المتفلور بالأخضر GFP+ قد ولدت عدداً مهماً لا بأس به من العصبونات (MAP2ab+)، وأيضاً بعض الخلايا قليلة التغصنات (RIP+)، وخلايا نجمية (GFAP+)، وخلايا غير متمايزة موجبة النستين (nestin+) (الشكل 1c). إن أثر الوسط المحيط هذا على التشكّل العصبي قوي جداً؛ فقد كانت هناك زيادة بمقدار ثمانية أضعاف من العصبونات GFP+, MAP2ab+ في الاستنبات المساند مقارنة بتلك الزيادة في الحالة التي تستخدم فيها ركائز مغطاة باللامينين أو البولي ليزين في استنباتات موازية، بيد أن نسب الخلايا النجمية GFAP+ وGFP+ أو الخلايا قليلة التغصنات RIP+، وGFP+ لم تتبدل تبديلاً معنوياً (الشكل 1d). وبالمقابل، لم يُزِد استخدام طبقة مغذّية من خلايا الأرومة الليفية الأولية

الشكل 1– تمايز الخلايا الجذعية العصبية البالغة في وسط محدد خالٍ من السيروم. a– تكاثر الخلايا الجذعية البالغة GFP+ بوجود FGF-2 (عامل نمو الأرومة الليفية-2)، استنبتت الخلايا على ركائز مغطاة باللامينين بوجود البرومودي أوكسي يوريدين بتركيز (2.5 μM) والعامل FGF-2 بتركيز 20 ng. ml-1 لمدة 36 ساعة ولوّنت من أجل البرومودي أوكسي يوريدين والنستين. السهم العلوي يشير إلى خلية BrdU-, nestin+. المقياس DAPI, 6 4–50μm. دي أميدينو–2– فينيل أندول. b,c– تمايز الخلايا الجذعية البالغة GFP+ المستنبتة على ركائز مغطاة باللامينين (b) أو مع عصبونات من حصين دماغي حديث الولادة وخلايا نجمية (c). لوّنت الخلايا باليوم 6 من الاستنبات من أجل واسمات العصبونات (MAP2ab) وواسمات الخلايا النجمية (GFAP)، و واسمات الخلايا قليلة التغصنات (RIP)، أو واسمات الخلايا غير مكتملة النمو (nestin) على الترتيب. يشير السهم العلوي إلى الخلايا النجمية موجبة الـ GFAP+ والـGFP+. d– تحديد كمي للمستنبتات بعمر 6 أيام. المعطيات المعروضة هي قيم وسطية ± s.e.m. من 4–8 تجارب في المستنبتات الموازية. الفروق المعنوية عن المجموعات الشاهدة (لامينين) معلّمة بنجمة واحدة (p<0.05, t-test) أو نجمتين (p<0.01,t-test).



هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

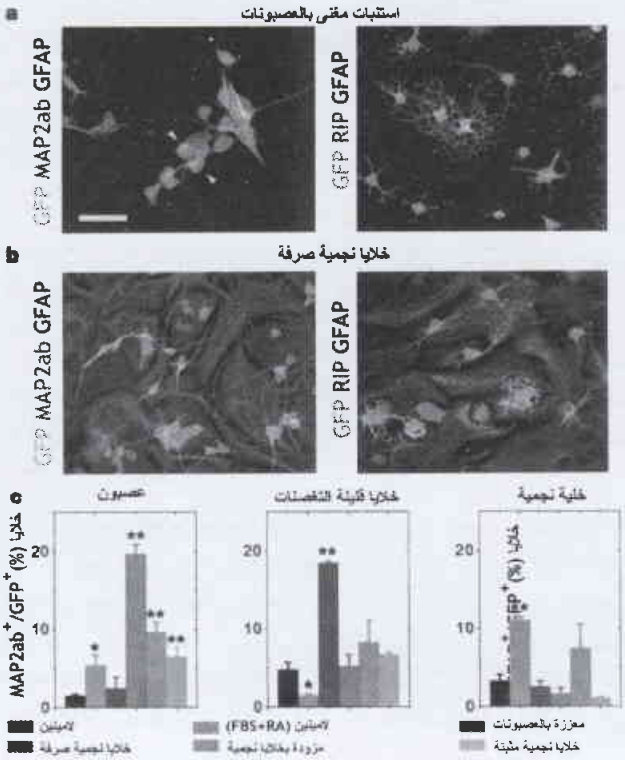
المأخوذة من جلد الجرذ [20] أيَّ تأثير معنوي ذي دلالة على التشكّل العصبي (الشكل 1d). وهكذا فإن هناك عوامل تتأتى من العصبونات الأولية في حصين الدماغ و/أو الخلايا النجمية تستطيع بشكل نوعي تحريض التشكّل العصبي من هذه الخلايا الجذعية العصبية البالغة ضمن وسط استنبات محدد خالٍ من السيروم.

التأثيرات التفاضلية للخلايا النجمية والعصبونات

طرحنا لاحقاً السؤال التالي: أيُّ الأنماط الخلوية ضروري لتحريض التشكّل العصبي؟ العصبونات أم الخلايا النجمية أم كلاهما؟ ولتقدير فيما إذا كان للعصبونات دور كبير في تحريض التشكّل العصبي قمنا بتحضير مستنبتات غنية بعصبونات أولية من حصين الدماغ الحديث الولادة، والحاوية على أكثر من 70% من العصبونات ($MAP2ab^+$) وأقل من 20% من الخلايا النجمية ($GFAP^+$).

وعندما تُصفَح الخلايا الجذعية البالغة في هذه المستنبتات الغنية بالعصبونات، لم نلاحظ أي زيادة معنوية في التشكّل العصبي مقارنة بصفائح الخلايا الجذعية الموضوعة فوق ركائز مغطاة باللامينين (الشكل 2a ,c)، موضحين بذلك أن هذه العصبونات الأولية غير كافية لتحريض التشكّل العصبي من الخلايا الجذعية البالغة تحت هذه الشروط. مع ملاحظة أن نسبة الخلايا قليلة التغصنات (RIP^+,GFP^+) في المستنبتات الغنية بالعصبونات تزداد تزايداً معنوياً(الشكل 2a,c)، ممّا يشير إلى أن العصبونات الأولية تحرض على زيادة إنتاج الخلايا قليلة التغصنات من الخلايا الجذعية العصبية البالغة [21]. وعندما استخدمنا العصبونات الأولية، خصوصاً من التلافيف المسننة dentate gyrus بدل العصبونات المأخوذة من كامل الحصين الدماغي، فإننا لاحظنا زيادة مشابهة في إنتاج الخلايا قليلة التغصنات دون أي زيادة في التشكّل العصبي (نتائج غير معروضة).

بحثنا بعد ذلك عما إذا كانت الخلايا النجمية وحدها كافية لتحريض التشكّل العصبي في شروطنا التجريبية. لذلك تمَّ تحضير خلايا نجمية مأخوذة من حصين دماغي حديث الولادة ($GFAP^+$: 95±3%; n=3) دون أي نسبة من الخلايا قليلة التغصنات الأولية (RIP^+) أو عصبونات ($MAP2ab^+$)، وذلك خلال ستة أيام تحت ظروف الاستنبات المساند (انظر الطرائق). ولاحظنا زيادة أكثر من عشرة أضعاف في النسبة المئوية لإنتاج العصبونات ($MAP2ab^+$, GFP^+) اعتباراً من الخلايا الجذعية البالغة على طبقة مغذّية من هذه الخلايا النجمية. مقارنة بتلك المستنبتة على ركائز مغطاة باللامينين في استنباتات موازية (الشكل 2b ,c). وهكذا بتضح أن الخلايا النجمية الأولية من حصين الدماغ وحدها كافية لتحريض التشكّل العصبي من هذه الخلايا الجذعية البالغة. فالخلايا النجمية تنتج مجموعة عوامل منحلة ومرتبطة بالغشاء الخلوي تؤثر كثيراً على وظائف متعددة في الجملة العصبية المركزية CNS [22]. ولاختبار فيما إذا كانت تأثيرات الخلايا النجمية على التشكّل العصبي تعتمد على عوامل منحلة منتشرة أو مرتبطة بالغشاء الخلوي، أضفنا طبقة خلايا جذعية بالغة إلى ركائز مغطاة ومزودة بطلائع خلايا نجمية دون تماس [23]، أو مباشرة إلى خلايا نجمية قليلة التثبيت [24]. ووجدنا زيادة في العصبونات (GFP^+, $MAP2ab^+$) وبشكل معنوي في كلتا الحالتين السابقتين أكثر



الشكل 2– التأثيرات البارزة المميزة للخلايا النجمية الأولية والعصبونات على الخيار المصيري للخلايا الجذعية العصبية البالغة. **a,b**– تمايز الخلايا الجذعية البالغة GFP^+ بمستنبتات مغناة بعصبونات حصين دماغي **(a)**، أو باستنبات خلايا نجمية صرفة **(b)**. تلون الخلايا في المستنبتات بعد 6 أيام من أجل الواسمات MAP2ab, GFAP، أو RIP على الترتيب. يشير السهم إلى العصبونات GFP^+ و $MAP2ab^+$، المقياس 25µm. **c**– تحديد كمي للمستنبتات بعد 6 أيام، المعطيات المعروضة هي قيم وسطية ± s.e.m. من 4-8 تجارب مستقلة بالزراعات الموازية. الفروق المعنوية عن المجموعة الشاهدة (لامينين) معلّمة بنجمة واحدة ($p<0.05$, t-test) أو نجمتين ($p<0.01$, t-test). Retinoic acid: RA.

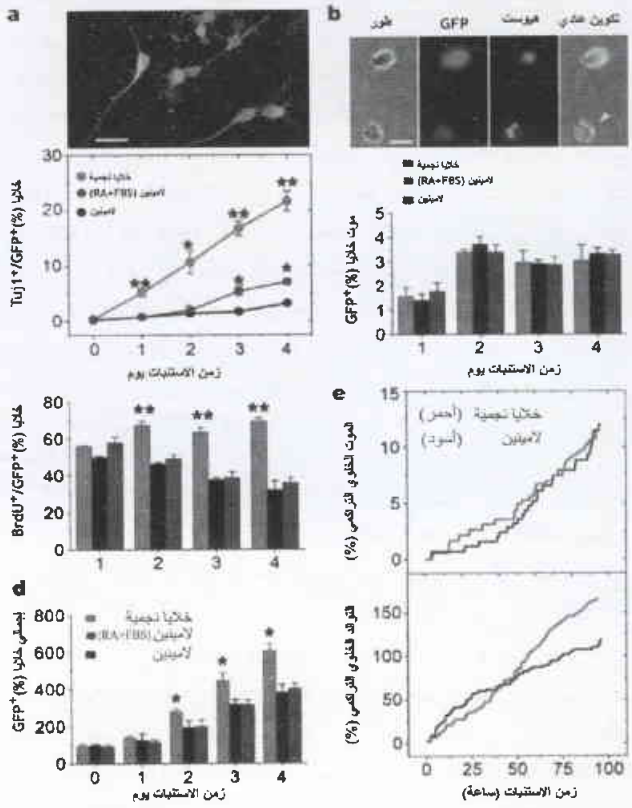
مما لاحظناه على الركائز المغطاة في استنباتات موازية (الشكل 2c). تشير هذه النتائج إلى أن كلاً من العوامل المنتشرة أو المرتبطة بالغشاء الخلوي مسؤولة عن تحريض التشكل العصبي من هذه الخلايا الجذعية الناضجة.

البقيا والتكاثر

إن تأثيرات الخلايا النجمية في الحصين الدماغي على التشكّل العصبي للخلايا الجذعية البالغة يمكن أن تُعزى إلى توافق بقيا العصبونات المعززة، وزيادة انقسامات الخلايا السلف progenitors، و/أو أوامر بالتزام المصير من قبل الخلايا الجذعية في خط سلالة عصبية. ونستطيع تقدير فيما إذا كانت الخلايا النجمية تُحرّض على البقيا الخلوية بقياسات مباشرة (تقدير معدّل الموت الخلوي) أو أنها تحرض على انقسام الخلايا السلف (تقدير معدّل توليد الخلايا). ولتحديد ما إذا كانت واحدة من هاتين الآليتين تلعب دوراً في زيادة التشكّل العصبي، فقد أوجدنا المسار الزمني الذي يستغرقه التشكل العصبي (المحدد بالتعبير عن واسم عصبي مبكر هو $Tuj1^+$). وكما يظهر (الشكل 3a) يبدو أن هناك إنتاجاً ثابتاً للعصبونات $Tuj1^+$ و GFP^+ في المستنبتات المساندة بوجود الخلايا النجمية.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

ولُوحظت تأثيرات الخلايا النجمية مبكراً بعد يوم واحد من التصفيح في المستنبت. بالإضافة إلى ذلك، فإن نتائج تجارب الوسم بالبرومودي أوكسي يوريدين BrdU أظهرت أن بعض الخلايا يستمر بالانقسام خلال أيام التجارب الأربعة (الشكل 3a).



الشكل 3- تأثيرات الخلايا النجمية على البقيا والتكاثر وتحديد المصير العصبي للخلايا الجذعية العصبية البالغة. **a**- المسار الزمني للتشكّل العصبي من الخلايا الجذعية العصبية البالغة. تستنبت الخلايا على خلايا نجمية من حصين دماغي أو على ركائز مغطاة باللامينين بغياب أو بوجود حمض الريتنوئيك (RA. 0.5μM) وسيروم جنين البقر (FBS, 0.5%) ثم تثبت بأزمان مختلفة وتلون من أجل واسم عصبي مبكر Tuj1، يظهر الجدول العلوي الخلايا الملونة من أجل الـ BrdU, Tuj1 في الاستنبات المساند (4 أيام) والتي أضيف إليها نبضة واحدة من البرومودي أوكسي يوريدين (0.5μM) لمدة 24 ساعة في اليوم الأول. **b**- الموت الخلوي في ظروف الاستنبات المختلفة كما تمّ تحديده يومياً بالتلوين بالحي باستخدام هيوست Hoechst33342 (2μg. ml^{-1}). وتظهر الصور العليا نموذج صور بالطور، والتفلور بالـ GFP، التفلور بالهيوست، والمندمجة merged. يشير السهم إلى خلية ميتة، المقياس: 2μm. **c**- تكاثر خلايا GFP^+ يحدده انجمال البرومودي أوكسي يوريدين، حضنت مستنبتات موازية بالبرومودي أوكسي يوريدين (2.5μM) بأزمان مختلفة لمدة 24 ساعة، متبوعة مباشرة بالتثبيت والتلوين من أجل البرومودي أوكسي يويدين. كل المعطيات هي قيم وسطية ± s.e.m. من 4-6 تجارب مستقلة بالمستنبتات الموازية. يشار إلى الفروق المعنوية عن مجموعة الشاهد (لامينين) بنجمة ($p<0.05$,t-test) أو نجمتين ($p<0.01$,t-test). **d**- العدد الكلي للخلايا GFP^+ في ظروف استنبات مختلفة. كل المعطيات (مشابهة للمجموعة c) تُستنظم إلى العدد الخلوي الكلي على ركائز مغطاة باللامينين في اليوم الأول (بعد 4 ساعات من النشر). **e**- التوليد الخلوي وموت الخلايا GFP^+ تحت شروط مختلفة كما حددتها الدراسة المجهرية على فواصل زمنية عبر 4 أيام. أخذت الصور كل 15 دقيقة، وحدّد الموت وتوليد الخلايا كمياً على مجموعة من الصور المتسلسلة.

كان تساؤلنا أولاً فيما إذا كان تناقص الطلائع العصبية أو الموت العصبي يستطيع أن يفسر زيادة أعداد العصبونات $Tuj1^+$ في المستنبتات المساندة بوجود الخلايا النجمية، هذه الخلايا المعروف عنها أنها تُحرّض على البقيا العصبية في المستنبتات الطويلة الأمد [25].

ولتقدير الموت الخلوي لسلف الخلايا الجذعية البالغة كمياً، استخدمنا الصباغ هيوست Hoechst 33342 بتركيز $2\mu g.ml^{-1}$ من أجل إظهار النُّويّات المتشظية المميزة للموت الخلوي المبرمج في الحي (الشكل 3b)، بدلاً من المستنبتات المثبتة. واستخدمت المستنبتات الحية لتفادي سوء تقدير الموت الخلوي العائد لانفكاك الخلايا المتموتة و/أو الخلايا الميتة عن ركائز المستنبتات، وقد أظهرت هذه التجربة نسبة مئوية قليلة من الخلايا المتموتة/الميتة وعدم وجود فروق معنوية بين الشروط التجريبية المختلفة في أي وقت اختبرت فيه هذه المستنبتات قصيرة الأمد (الشكل 3b). وهكذا فإن البقيا العصبية الفُضلى ليس لها دور مهمّ ومعنوي في زيادة التشكّل العصبي الإجمالي الملاحظ في هذه المستنبتات المساندة قصيرة الأمد بوجود الخلايا النجمية.

وفي مرحلة تالية اختبرنا احتمال مساهمة تكاثر الخلايا السلف في التشكّل العصبي الملاحظ، ولهذا الغرض حضنت مستنبتات موازية لخلايا جذعية بالغة GFP^+ مع البرومودي أوكسي يوريدين بتركيز 2.5 μM لمدة 24 ساعة بعد الأيام 0، 1، 2، 3 من التصفيح، متبوعة مباشرة بتثبيت وتحليل الأعداد الكلية للخلايا وانجمال البرومودي أوكسي يوريدين BrdU. ولاحظنا فيما يخص الخلايا الجذعية GFP^+ المستنبتة على ركائز مغطاة باللامينين تناقصاً متدرجاً بالنسبة المئوية لأعداد الخلايا (GFP^+, $BrdU^+$) التي كانت تتكاثر خلال تجارب الأيام الأربعة (الشكل 3c). أما فيما يخص الخلايا الجذعية بالاستنبات المساند مع الخلايا النجمية فقد كانت نسبة الخلايا GFP^+ المتكاثرة خلال فترة الأربع والعشرين ساعة الأولى مشابهة لتلك الملاحظة في المستنبتات على ركائز مغطاة باللامينين، ولكنها أصبحت أعلى معنوياً في أوقات متأخرة من الاستنبات (الشكل 3d). تشير هذه النتائج إلى أن هناك عوامل من الخلايا النجمية تُحرّض حقاً على تكاثر الخلايا العصبية البالغة السلف. وبالتناغم مع نتائج الوسم بالبرومودي أوكسي يوريدين فإننا لاحظنا خلايا GFP^+ أكثر معنوياً في المستنبتات المساندة بوجود الخلايا النجمية مقارنة بالمستنبتات على ركائز مغطاة باللامينين بعد يومين من الاستنبات (الشكل 3d). وقد أكدت تجارب أجريت على فترات زمنية Time-lapse أنه لايوجد فرق معنوي بموت الخلايا في مختلف شروط الاستنبات في تجارب الأربعة أيام. وأن هناك زيادة في التكاثر الخلوي في الاستنباتات المساندة بوجود الخلايا النجمية (الشكل 3e)، وتوضح هذه النتائج مجتمعة على الأقل أن جزءاً من أثر الخلايا النجمية على التشكّل العصبي يمكن أن يعزى إلى تكاثر الأسلاف العصبية.

تحديد المصير العصبي

هل تعزى تأثيرات الخلايا النجمية على التشكّل العصبي كلياً إلى انقسام الخلايا السلف أم أن الخلايا النجمية تأمر الخلايا السلف لتعتمد مصيراً عصبياً؟ لمعالجة هذا الموضوع وللتصدي لهذا السؤال طورنا تصوراً رياضياً للتشكّل العصبي (كما يوضحه الشكل 4a) الذي سمح لنا بفصل

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

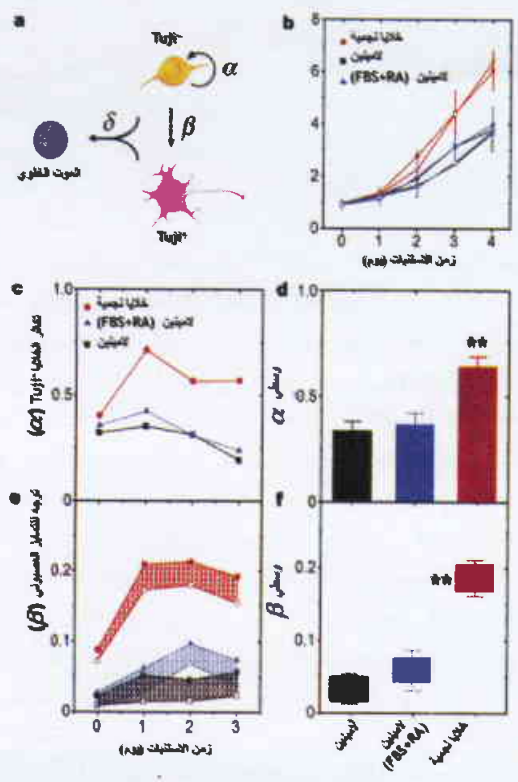
التأثيرات التقريرية instructive عن الاحتمالات الأخرى. وبتصورنا الكمي للعملية، حددنا المعامل α_j المعبّر عن معدّل الانقسامات (باليوم) للخلايا السليفة وذلك في اليوم j من الاستنبات، والمعامل β_j المعبّر عن تحول الخلايا السلف ($Tuj1^-$) إلى عصبونات ($Tuj1^+$) في اليوم نفسه، والمعامل δ_j المعبّر عن المعدّل الكلي للموت الخلوي باليوم. ويقاس معدل الانقسامات α_j بتقدير النسبة المئوية للخلايا GFP^+ التي ينجبل فيها البرومودي أوكسي يوريدين بفترة 24 ساعة (الشكل 3d). واستخدم هذا المعدّل المقيس للتنبؤ (استقراء) عن أعداد الخلايا GFP^+ الكلية التي يتم تعدادها في المستنبتات نفسها. ولم يصادف أي فرق معنوي لأعداد الخلايا GFP^+ سواء قيست مباشرة، (إشارات مملوءة الشكل 4b)، أم بالاستقراء النظري (إشارات مفتوحة الشكل 4b). أما معدّل الموت الخلوي δ فقد قيس مباشرة باستخدام صباغ هيوست Hoechst 33342 في المستنبتات الحية (الشكل 3b).

من ناحية ثانية لم يكن بمقدورنا تحديد أي الأجزاء من الخلايا المتموتة والميتة كانت عصبونات. فقد سمح لنا تعداد العصبونات ($Tuj1^+$) و GFP^+ يومياً بتقدير الحدود العليا والدنيا لمعدّل تحول (β_j) الخلايا السلف إلى عصبونات (الشكل 4e). تمّت هذه التقديرات بالافتراضات الحدّية أن العصبونات لم تمت أو أن كل الخلايا التي ماتت كانت عصبونات. واعتماداً على هذه التقديرات، استنتجنا أن تكاثر الخلايا الجذعية البالغة كان أسرع تقريباً بمرتين بوجود الخلايا النجمية (الشكل4d) مقارنة بتلك المستنبتات على الركائز المغطاة باللامينين مع أو بدون إضافة حمض الريتنويك بتركيز 0.5μM وسيروم جنين البقر FBS بتركيز 0.5%. وأكثر من ذلك، وبأكثر أهمية، فإن معدّل تحول الخلايا السلف إلى عصبونات كان أعلى حوالي 6 مرات بالنسبة للخلايا الجذعية البالغة بالمستنبتات المساندة بوجود الخلايا النجمية (الشكل 4b). وهكذا فإننا قادرون على أن نوضح كمياً أن الخلايا النجمية في حصين الدماغ تزيد من معدّلات التكاثر وتحديد المصير العصبي للخلايا الجذعية البالغة المعتمدة على عامل نمو الأرومة الليفية FGF-2.

التخصص التطوري والمحلّي

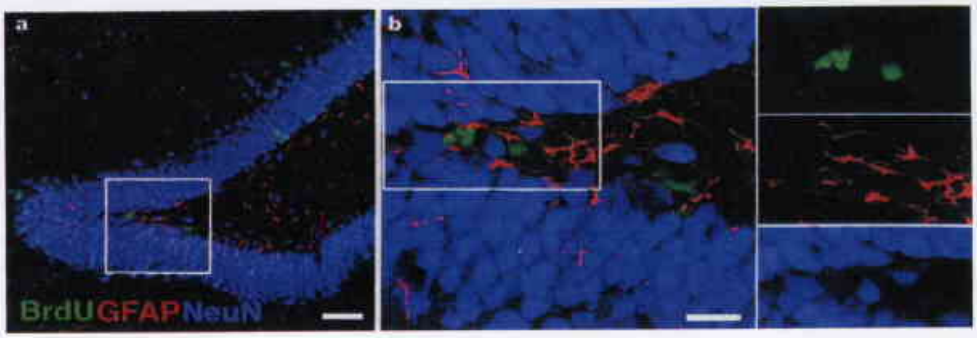
طرحت هذه النتائج السؤال فيما إذا كانت بعض تحت الأنماط المتميزة من الخلايا الدبقية تتوضع في مناطق خاصة لتنظيم التشكّل العصبي في الدماغ عند البالغ. ولاختبار تأثيرات الوسط المحيط المحلّي على التشكّل العصبي عند البالغ في الحي، قمنا بوسم الجماعات الخلوية المنقسمة بما في ذلك الخلايا الجذعية العصبية البالغة في التلافيف المسنّنة لحصين دماغ البالغ، وذلك بحقن نبضي بالبرومودي أوكسي يوريدين. كانت معظم الخلايا الموسومة بـBrdU متوضعة قرب الطبقة الجزيئية الداخلية وبترابط وثيق مع الخلايا النجمية $GFAP^+$ في التلافيف المسنّنة لحصين الدماغ البالغ، وكانت سالبة لأي من الواسمات العصبونية والدبقية في هذه الطبقة (الشكل 5). وخلال أسبوع من الانقسامات الخلوية، فإن بعض أنسال الخلايا المتكاثرة الناجمة عن الانقسامات الخلوية قد بدأ بالتعبير عن الواسمات المشتركة للعصبونات غير الناضجة وخلايا الدبق العصبي [20]. ومما تجدر ملاحظته أنه كلما نضجت عصبونات حبيبية متولدة حديثاً فإنها تهاجر للطبقة الحبيبية [26]، حيث تتجمع أجسام خلايا العصبونات الحبيبية بكثافة مع تعرض أقل للخلايا النجمية $GFAP^+$. ومؤخراً تمّ تحديد عشّ دموي مناسب للتشكّل العصبي في حصين الدماغ البالغ [20]. ومعروف أن الخلايا النجمية تكون على اتصال وثيق مع الوعائية الدموية [28,27]، ولذلك فإنها ربما تزود بجزء مهمّ من العناصر الخلوية التي تنظم التشكّل العصبي عند البالغ في التلافيف المسنّنة.

لاختبار فيما إذا كانت الخلايا النجمية تنظم أيضاً التشكّل العصبي، فإننا أجرينا استنباتاً مساندا للخلايا الجذعية البالغة GFP^+ مع خلايا نجمية مأخوذة من حصين دماغ جرذان بالغة (الشكل 6a)، ووجدنا زيادة معنوية في العصبونات GFP^+ و $MAP2ab^+$، في المستنبتات المساندة بوجود خلايا نجمية من الحصين الدماغي البالغ، مقارنة بتلك المستنبتات على ركائز مغطاة أو بوجود خلايا أرومة ليفية من الجلد (الشكل 6c). ومع ذلك فإن تحريض التشكّل العصبي بالخلايا النجمية المأخوذة من حصين



الشكل 4– الخلايا النجمية تزيد معدلات التكاثر الخلوي وتحديد المصير النهائي للخلايا الجذعية العصبية البالغة. a– حالات الخلايا الناشئة عن الخلايا الجذعية العصبية البالغة في المستنبتات. α: معدّل الانقسام الخلوي (باليوم) لغير العصبونات ($Tuj1^-$)، β: معدّل تحول الخلايا السلف ($Tuj1^-$) إلى عصبونات ($Tuj1^+$)، δ: معدّل الموت الخلوي لكل الخلايا. b– مقارنة لأعداد الخلايا الكلية من قياسات مباشرة (إشارات مملوءة) وقيم نظرية متوقعة (إشارات فارغة) انظر الطرائق. لايوجد فروق معنوية بين هذين الشرطين في كل المستنبتات. c,d– معدّلات الانقسام الخلوي للخلايا $Tuj1^-$ (α)، يلاحظ المسار الزمني لـ α(c)، والقيم المتوسطة ± s.e.m. للأيام الثلاثة الأخيرة (d). e, f– معدّلات تحول خلايا $Tuj1^-$ إلى خلايا $Tuj1^+$ (β). الحدود العلوية (إشارة مملوءة) والحدود الدنيا (إشارة مفتوحة) لقيم β في كل ظرف موضحة أيضاً (e). القيم الوسطية ± s.e.m. للأيام الثلاثة الأخيرة مشار إليها (f). ويشار إلى الفروق المعنوية بنجمتين ($p<0.01$,t-test).

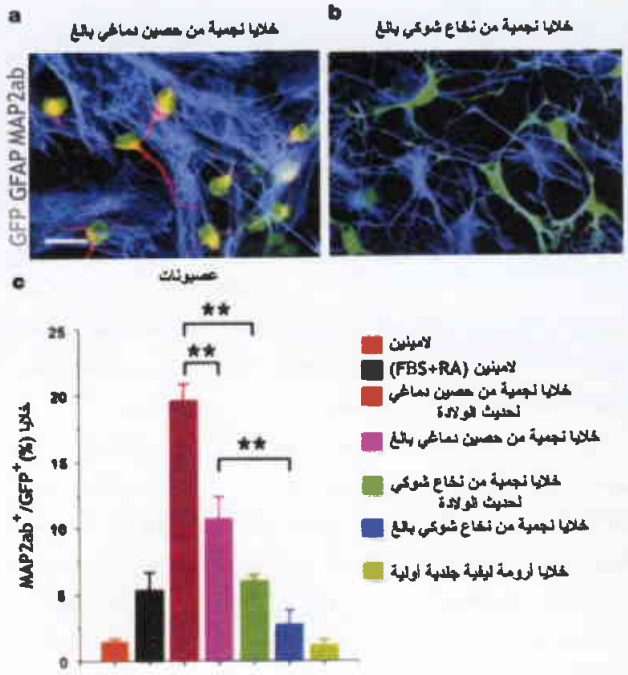
هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 5– الارتباط الوثيق للخلايا المتقسمة مع الخلايا النجمية $GFAP^+$ في التلافيف المسنّنة لحصين دماغي عند البالغ. عوملت جرذان عمرها 3 أشهر بنبضة واحدة من البروموديّ أوكسي يوريدين ($50mg.Kg^{-1}$) ثلاث مرات يومياً ولمدة ثلاثة أيام. ثبّتت النسج بعد يوم من آخر حقن بالبروموديّ أوكسي يوريدين وتلوّن لإظهار البروموديّ أوكسي يوريدين (أخضر)، وواسم الخلايا النجمية GFAP (أحمر). والواسم العصبي NeuN (أزرق). توضح المنطقة داخل المربع في a بتكبير أعلى في b. المقياس في a:10μm وفي b: 2μm.

منسجم و متوافق مع الملاحظات في الحي التي تدل على أن معدّل التشكّل العصبي يتناقص بزيادة العمر [29].

كما ذكرنا سابقاً، يحدث تشكّل عصبي فعّال عند البالغ في المنطقة تحت البطينية والمنطقة تحت الحبيبية من التلافيف المسنّنة في الحصين الدماغي وليس في مناطق أخرى من الجملة العصبية المركزية السليمة CNS [2،4–7]. إضافة إلى ذلك، يمكن عزل خلايا جذعية متعددة القدرات من مناطق عديدة غير عصبية المنشأ [11–14]، مثل النخاع الشوكي عند البالغ [11، 12] وكانت ملاحظاتنا أن الخلايا النجمية في الحصين الدماغي تستطيع أن تحرض على التشكّل العصبي من الخلايا الجذعية البالغة، وهذا يرجح احتمالية غياب التشكّل العصبي في النخاع الشوكي عند البالغ بسبب غياب الإشارات الخاصة بالخلايا النجمية في النخاع الشوكي . ولاختبار هذه الاحتمالية أجرينا استنباتاً مسانداً للخلايا الجذعية GFP^+ مع خلايا نجمية من نخاع شوكي لحديث الولادة أو من نخاع شوكي عند البالغ (الشكل 6b)، ووجدنا أن الخلايا النجمية من النخاع الشوكي لحديث الولادة حرّضت على بعض التمايز العصبوني لهذه الخلايا الجذعية البالغة، ولكن وجدنا أيضاً أن الخلايا النجمية البالغة من النخاع الشوكي تدعم التشكّل العصبي (الشكل 6c). وعلى نقيض ذلك، كانت هناك زيادة بنسبة الخلايا النجمية $GFAP^+$ و GFP^+ والخلايا قليلة التغصنات RIP^+ و GFP^+ باستنبات مساند مع خلايا نجمية من النخاع الشوكي (معلومات غير معروضة). توضح هذه النتائج أن الخلايا النجمية من مناطق مختلفة من الجملة العصبية المركزية CNS وفي مراحل تطورية مختلفة تظهر مقدرات مختلفة لتنظيم اختيار مصير الخلايا الجذعية البالغة.



الشكل 6– تحرض الخلايا النجمية الناضجة من الحصين الدماغي البالغ ولكن ليس من النخاع الشوكي البالغ، على التشكل العصبي من الخلايا الجذعية البالغة. a, b– تمايز الخلايا الجذعية العصبية GFP^+ باستنبات مساند مع الخلايا النجمية المأخوذة من حصين دماغي بالغ (a) أو نخاع شوكي بالغ (b)، تلوّن الخلايا باستنبات لمدة 6 أيام لإظهار MAP2ab وGFAP، المقياس: 5μm. c– تقدير كمي للنسبة المئوية للعصبونات $MAP2ab^+$, GFP^+ في شروط مختلفة (استنبات 6 أيام) القيم المعروضة هي وسطي قيم s.e.m. ± لأربع إلى ثماني تجارب باستنباتات موازية. الفروق المعنوية بين النتائج المتعلقة بالخلايا النجمية من الحصين الدماغي والنخاع الشوكي مشار إليها بنجمة مضاعفة ($p<0.01$,t-test).

المناقشة

اختبرنا في هذه الدراسة تنظيم الخيارات المصيرية للخلايا الجذعية المتحدرة من خلايا جذعية بالغة معتمدة على عامل نمو الأرومة الليفية FGF-2، الذي تمارسه أنماط خلوية مختلفة يمكن أن توجد في عشّ الخلايا المتكاثرة ضمن الدماغ عند البالغ. وقد أوضحنا أن العصبونات الأولية تحرّض على تمايز الخلايا القليلة التغصنات في حين تستطيع الخلايا النجمية في الحصين الدماغي بعد الولادة أن تنظّم تنظيماً فعّالاً التشكّل العصبي من الخلايا الجذعية العصبية البالغة. وقد بيّنا بمقاربة كمية أن هناك عوامل تفرزها وتحررها الخلايا النجمية تستطيع أن تزيد من معدّل تحديد المصير العصبوني وتكاثر أنسالها تقريباً ستة أضعاف وضعفين على الترتيب (الشكل 4).

وخلال تطور الجملة العصبية المركزية CNS عند الثدييات، تنشأ العصبونات والخلايا الدبقية اعتباراً من أسلاف متعددة المقدرة الكامنة في سلسلة مقولبة stereotyped sequence تتشكّل العصبونات من خلالها

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

أولاً، وخلال الفترة الجنينيةَ في المقام الأول، متبوعة بتشكّل خلايا الدبق العصبي التي يتمايز معظمها بعد أن تكون العصبونات قد تولدت [3، 27- 28]. ومعروف أن الخلايا العصبية النجمية تدعم كلاً من تكاثر وبقيا وإتمام نمو العصبونات المتطورة والأورمات العصبية التي حُدِّدت ووجِّهت للتحول إلى سلالة عصبونية [27, 28, 30]، وبالإضافة إلى ذلك وعلى قدم المساواة تنشّط الخلايا النجمية التشكّل العصبي من الخلايا السلف في المنطقة تحت البطينية [24].

وفي دماغ الثدييات تام النمو، تشكّل الخلايا النجمية تقريباً نصف إجمالي عدد الخلايا، موفّرة للعصبونات الدعم البنيوي والاستقلابي والغذائي tropic [27، 28]. وحديثاً فقط اقترحت الأدوار الفاعلة للخلايا النجمية أكثر من الأدوار الداعمة في الجملة العصبية المركزية عند البالغ. فعلى سبيل المثال، وصفت الخلايا النجمية على أنها تحرّض و/ أو تؤمن استقرار المشابك في الجملة العصبية المركزية CNS [31، 32]، وربما تكون قادرة على دمج المداخل العصبونية وتنظيم الفعالية المشبكية [33-36]، وعلى خلاف التشكّل العصبي خلال التطور الجنيني- حيث لاتكون معظم الخلايا النجمية قد تولّدت بعد- تكون الخلايا الجذعية العصبية متوضّعة في وسط مختلف بشكلٍ كبير. وفي التلافيف المسننة للحصين الدماغي عند البالغ تكون الخلايا النجمية بتماس وثيق مع الخلايا المتكاثرة في الحي (الشكل 5). تشير نتائجنا إلى أن للخلايا النجمية وظائف فعالة أكثر من الوظيفة الداعمة في الدماغ عند البالغ؛ فالخلايا النجمية في الحصين الدماغي تفرض تحديد مصير الخلايا الجذعية. وخلايا الدبق النجمية الشعاعية التي تكون تحت جماعة من طلائع خلوية تتولد قبل التكوّن العصبي الجنيني، وتبيّن حديثاً أن لها المقدرة على إعطاء عصبونات [37، 38]. ويبقى علينا اختبار ما إذا كانت الخلايا الدبقية الشعاعية تنظم مباشرة التشكّل العصبي خلال التطور الجنيني.

ينحصر التشكّل العصبي الفعال في مناطق متفردة من الجملة العصبية المركزية السليمة عند الثدييات البالغة [1-4]. وعلى مايبدو فإن الوسط المحلّي يملي على الخلايا الجذعية البالغة خياراتها المصيرية [6, 15, 16, 39]. فعلى سبيل المثال، تنشأ من الخلايا الجذعية العصبية المشتقة من الحصين الدماغي عند البالغ أو النخاع الشوكي عصبونات بعد تطعيمها إلى التلافيف المسنّنة الدماغية لا إلى النخاع الشوكي [16]. وفي مناطق من القشرة الحديثة neocortex في الثدييات البالغة والتي بالعادة لاتتضمن أي تشكّل عصبي، فإن هناك طلائع عصبية داخلية المنشأ تستطيع في المكان in situ أن تتمايز إلى عصبونات بعد تحريض تهتّك تموتي مبرمج متزامن للعصبونات القشرية المهادية corticothalamic في المناطق المجاورة [6]. وبالتوافق مع الملاحظات في الحي [5]، فقد تبيّن لنا أن الخلايا النجمية من النخاع الشوكي عند البالغ، وهو إحدى المناطق التي لاتتميز بتشكّل عصبي غير فعالة بتحريض التشكّل العصبي اعتباراً من الخلايا الجذعية البالغة. وتقودنا هذه النتائج إلى اقتراح أن الخلايا النجمية في الحصين الدماغي مزوّدة بعشّ فريد ملائم للتشكّل العصبي عند البالغ وأنها تبدي الإمكانية الزائفة التي مفادها أن إمكانية ومقدرة التشكّل العصبي عند البالغ يمكن أن تعزى جزئياً إلى بعض الإشارات المحددة التي تعطيها وتحررها، بحسب المناطق، خلايا نجمية متخصصة في الجملة العصبية المركزية البالغة.

الطرائق

استنبات الخلايا

تُعزل الخلايا الجذعية المنسلة clonal derived من الحصين الدماغي لجرذان من سلالة فيشر Fisher 344 البالغة المستخدمة في هذه الدراسة والتي تمَّ توصيفها سابقاً [10، 17]. ثمّ تخمج بفيروس قهقري لتعبر عن البروتين المتفلور بالأخضر GFP، وتنتخب وتتكاثر على دوارق مغطاة باللامينين ضمن وسط DEMF/F12 يحوي على الداعمة المغذّية N2، والغلوتامين L-glutamine بتركيز 2mM وعامل نمو الأورمة الليفية FGF-2 بتركيز $20\ ng.ml^{-1}$ كما وصفت من قبل [10، 17]. بخصوص التمايز تعامل الخلايا الجذعية بالتربسين وتنشر في وسط محدد خالٍ من السيروم (وسط استنبات مساند) حاوٍ على MEM والداعمة المغذية N2 وبيروفات الصوديوم (1mM)، والغلوكوز (0.2M) والغلوتامين (2mM). تحضر الخلايا النجمية الأولية من الحصين الدماغي أو من النخاع الشوكي بعد اليوم الأول من الولادة (P0) أو من جرذان بالغة (عمرها أكثر من 6 أسابيع) بشكلٍ أساسي كما وصفت سابقاً [23، 40-42]. والمهمّ معاملة الخلايا النجمية المتجمعة والمتشابكة بالسيتوزين أرابينوزيد cytosine arabinoside بتركيز (20 µM) لمدة 72 ساعة للتخلص من الخلايا المنقسمة، ثم توضع في وسط استنبات طازج لمدة 24 ساعة لتعود إلى وضعها الطبيعي. ويمكن تكرار هذه الخطوات للتخلص من كافة الأنماط الخلوية الأخرى [41، 42]. وفي هذه الشروط تكون معظم الخلايا خلايا نجمية $GFAP^+$ و/ أو $S\text{-}100\beta^+$ مع تلوث قليل بخلايا $MAP2ab^+$ أو RIP^+ خلال ستة أيام تحت ظروف الاستنبات المساند. يتم تحضير العصبونات الأولية من الحصين الدماغي في اليوم الأول بعد الولادة كما وصفت سابقاً [40]، وتصفح بتركيز 10.000 خلية/سم^2 على طبقة مغذية من الخلايا النجمية المتشابكة المأخوذة من الحصين الدماغي في اليوم الأول بعد الولادة في وسط استنبات مساند. وبخصوص المستنبتات المغناة بالعصبونات فإنه يتم تحضير عصبونات (P0) من مجمل الحصين الدماغي أو من التلافيف المسنّنة فقط وتصفح بتركيز 10.000 خلية/ سم^2 على سواتر رقيقة مغطاة بالبولي ليزين poly-lysine وتستنبت لمدة يومين في وسط MEM حاوٍ على الداعمة المغذية N2، وسيروم الحصان 10%، وبيروفات الصوديوم (1mM)، والغلوكوز (0.2M) والسيتوزين أرابينوزيد (5µM). ثمّ يغيّر الوسط إلى وسط استنبات مساند طازج، وتعيش هذه المستنبتات أكثر من أسبوعين بحيث تحوي على أكثر من 70% من التعداد الكلي للخلايا من العصبونات $MAP2ab^+$ وأقل من 20% من الخلايا النجمية $GFAP^+$. تستنبت خلايا الأورمة الليفية الأولية من جلد الجرذان Fisher 344 [20] في وسط DMEM حاوٍ على 10% من FBS ولايحوي أي خلايا $MAP2ab^+$, $GFAP^+$، أو RIP^+ يمكن ملاحظتها.

في تجارب المستنبتات المساندة، تستنبت خلايا الركيزة على سواتر رقيقة مغطاة بالبولي ليزين والكولاجين حتى تصبح متشابكة، وتحضر

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الطبقات المغذية للخلايا النجمية المثبتة تثبيتاً خفيفاً بواسطة 70% من الإيتانول المبرّد بدرجة حرارة 20°C ولمدة 30 دقيقة [24]. ومن أجل الاستنبات المساند باستخدام مستنبت بانكر Banker، فإن الخلايا النجمية تستنبت بقاع صفائح 24 بئراً بحيث تكون السواتر الرقيقة المغطاة باللامينين موضوعة بالبئر نفسها دون تماس [23]. وتحضن خلايا الركيزة أو الموضوعة على سواتر رقيقة بوسط استنبات مساند طيلة الليل قبل أن تضاف الخلايا الجذعية CFP^+ بتركيز 10.000 خلية / سم^2 بشكل موازٍ لكل شروط الاستنبات، وتغذى المستنبتات يومياً، ويضاف البرومودي أوكسي يوريدين BrdU (2.5µM) إلى بعض المستنبتات لوسم الخلايا المنقسمة.

الكيمياء الخلوية المناعية والتقدير الكمي

حُضّرت المستنبتات للدراسة الكيميائية الخلوية المناعية كما وصف سابقاً [10، 17]، ولهذا الغرض استخدمنا الأضداد الأولية التالية:

- البرومودي أوكسي يوريدين (1: 400, rat; accurate).
- النستين nestin (1: 1.000, mouse; pharmingen).
- التوبولين β-tublin من النمط α-type III (Tuj1,1:1,000, mouse;BAVCO).
- MAP2ab(1:250,mouse; Sigma).
- RIP(1:25, mouse; Hybrodoma Bank).
- S-100β(1:500,rabbit;Sigma).
- GFAP(1:500, guinea-pig; advance Immuno) أو

(1:1,000, rabbit; Dako).

يتطلب الكشف عن البرومودي أوكسي يوريدين في الخلايا المستنبتة معالجتها بحمض HCN بتركيز 1M بدرجة حرارة 37°C لمدة 30 دقيقة [10]. وتؤخذ الصور بواسطة جهاز Bio-Rad متحد البؤر بتكبير x40أو x63 بمجموعات فلاتر فردية لكل قناة ويتمّ تجميعها باستخدام برنامج فوتوشوب.

تمّ إظهار الخلايا الموسومة المتفلورة باستخدام مجهر متحد البؤر ويتم تقدير الخلايا الموجبة كمياً في 20 حقلاً على الأقل تقديراً منظّماً عبر السواتر الرقيقة المغطاة في 4 إلى 8 تجارب للاستنباتات الموازية. وأجريت التحاليل الإحصائية باستخدام Prizm.

التسجيلات على فواصل زمنية

تضاف الخلايا الجذعية GFP^+ على ركائز مختلفة وتستنبت لمدة 4 أيام في حجرات تسجيل بوجود ($5\% CO_2$) وبدرجة حرارة 37°C في مرحلة الدراسة المجهرية، وتؤخذ صور الأطوار والفلورة كل 15 دقيقة، وبشكل مبكر يتم تحديد الموت الخلوي والتوليد الخلوي بوضوح على صور متسلسلة يتم تحليلها على فترة 4 أيام.

التحليلات الكمية للتشكل العصبي من الخلايا الجذعية البالغة

يوضح الشكل 4a التوصيف التبسيطي لتجاربنا، حيث N_{j+1} هو عدد الخلايا الكلي الموجودة في بداية اليوم $(j+1)$ من الاستنبات و n_{j+1} هو العدد الكلي للعصبونات ($Tuji^+$ cells) الموجودة في هذا اليوم، أما α_j فيعبر عن معدّل انقسام الخلايا غير العصبية ($Tuji^-$ cells) في اليوم j، و β_j يعبّر عن معدّل تحول الخلايا السلف إلى عصبونات في هذا اليوم. أما δ_j يعبّر عن معدّل الموت الخلوي. على سبيل المثال، إن عدد الخلايا التي تموت خلال اليوم j من الاستنبات هو $\delta_j N_j$. وتحدد المعدّلات الأخرى بطريقة مماثلة. فعدد الخلايا الكلي الموجودة في بداية اليوم $(j+1)$ يعطى عندها بالمعادلة:

$$N_{j+1} = (1+\alpha_j)x(N_j-n_j) + n_j-\delta_j N_j$$

حيث يعبّر $(1+\alpha_j)$ عن الإسهام بالعدد الناجم عن انقسام الخلايا السلف.

ويعبر (N_j-n_j) عن عدد العصبونات الموجودة (المفترض أنها لاتنقسم) و$(n_j-\delta_j N_j)$ يعبّر عن المساهمة التي تعزى إلى الموت الخلوي.

ويُعطى معدّل الانقسام الخلوي α_j أيضاً بالمعادلة:

$$N^*_{j+1} = 2\alpha_j(N_j-n_j)$$

حيث N^*_{j+1} يعبّر عن عدد الخلايا الموسومة بالبرومودي أوكسي يوريدين في بداية اليوم $(j+1)$.

أخيراً فإن عدد العصبونات الموجودة في بداية اليوم $(j+1)$ يعطى بالمعادلة:

$$n_{j+1} = n_j + \beta_j(N_j-n_j)-\delta_j^n n_j$$

حيث δ_j^n هو معدّل موت العصبونات. و $\delta_j^n n_j$ يعطي عدد العصبونات التي تموت خلال اليوم j.

وتنص هذه المعادلة أن عدد العصبونات الموجودة في بداية اليوم $(j=1)$ يتألف من عدد العصبونات الموجودة في بداية اليوم (n_j) مضافاً إليه عدد العصبونات الناجمة عن تحول الخلايا السلف $\beta_j(N_j-n_j)$، مطروحاً منها عدد العصبونات التي تموت. ونحن لانعرف العدد المعبر عن الموت هذا. ولكن المتراجحة التالية تضع حدود الموت العصبي $0 \geq \delta^n_j N_j \geq 0$.

ويسمح مجمل هذه المعادلات مع الأعداد المحددة والمقيسة للخلايا GFP^+ الكلية، والعصبونات والخلايا الموسومة بالبرومودي أوكس يوريدين وعدد الخلايا الميتة كل يوم بالحصول على قيم δ_j, β_j, α_j (انظر الشكل 4).

الوسم بالبرومودي أوكسي يوريدين في الحي

تحقن جرذان من سلالة Fisher 344 بعمر 3 أشهر بالبريتوان intrapertoneally تسع مرات مع البرومودي أوكسي يوريدين بتركيز (50mg. kg^{-1}) خلال فترة ثلاثة أيام، وتثبت النسج بعد آخرحقن بيوم واحد. تعالج النسج من أجل التلوين المناعي كما وصف سابقاً [20].

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

REFERENCES المراجع

[1]- Temple, S. & Alvarez-Buylla, A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. Curr. Opin. Neurobiol. 9, 135-141 (1999).

[2]- Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. Science 287,1433-1438 (2000).

[3]- Temple, S. The development of neural stem cells. Nature414, 112-117 (2001).

[4]- Rakic, P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. J. Neurosci. 22, 614-618 (2002).

[5]- Hornet, P. et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. J. Neurosci. 20, 2218-2228 (2000).

[6]- Magavi, S. S. Leavitt, B. R. & Macklis, J. D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature 405, 892-893 (2000).

[7]- Kornack, D. R. & Rakic, P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. Science 249, 2127-2130 (2001).

[8]- Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 255, 1707-1710 (1992).

[9]- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia, Proc. Natl Acad. Sci. USA 90, 2074-2077 (1993).

[10]- Palmer, T. D., Takahashi, J. & Gage, F. H. the adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. Mol. Cell. Neurosci. 8, 389-404 (1997).

[11] -Shihabuddin, L. S., Ray. J. & Gage, F. H. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. Exp. Neurol. 148, 577-586 (1997).

[12] - Kehl, L. J., Fairbanks, C. A., Laughlin, T. M. & Wilcox, G. L. Neurogenesis in postnatal rat spinal cord: astudy in primary culture. Science 276, 586-589 (1997).

[13] -Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F. & Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. J. Neurosci. 19, 8487-8497 (1999).

[14] -Kondo, T. & Raff, M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. Science 289, 1754-1757 (2000).

[15] -Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Ray, J. & Gage, F. H. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. Nature 383, 624-627 (1996).

[16] - Shihabuddin, L. S., Horner, P. J., Ray, J. & Gage, F. H. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. J. Neurosci. 20, 8727-8735 (2000).

[17] - Takahashi, J., Palmer, T. D. & Gage, F. H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. J. Neurobiol. 38, 65-81 (1999).

[18] - Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & Mckay, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60, 585-595 (1990).

[19] - Qian, X. et al. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. Neuron 28, 69-80 (2000).

[20] - Palmer, T. D., Willhoite, A. & Gage, F. H. Vascular niche for adult hippocample neurogenesis. J. Comp. Neural. 425, 479-494 (2000).

[21] - Barres, B. A. & Raff, M. C. Axonal control of oligodendrocyte development. J. Cell Biol. 147, 1123-1238 (1999).

[22] - Ridet, J. R., Malbotra, S. K., Privat, A. & Gage, F. H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. Trends Neurosci. 20, 570-577 (1997).

[23] - Goslin, K., Asmussen, H. & Banker, G. in Culturing Nerve Cells(eds Banker, G. & Goslin, K.) 339-370(the MIT press, Cambridge, Massachusetts, 1998).

[24] - Lim, D. A. & Alvarez-Buylla, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. Proc. Natl Acad Sci. USA 96, 7526-7536 (1999).

[25] - Banker, G. A. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. Science 209, 809-810 (1980).

[26] - Cowan, W. M, Stanfield, B. B. & Kishi, K. in Current Topics in Developmental Biology(ed. Hunt, K.) 103-157(Academic, New York, 1980).

[27] - Nicholls, J. G., Martin, A. R. & Wallace, B. C. From Neuron To Brain 3rd edn, 149-152(Sinauer, Sunderland, Massachussetts, 1992).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[28] - Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. Principle of Neural Science(McGraw-Hill, New York, 2000).

[29] - Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J. Neurosci. 16, 2027-2033 (1996).

[30] - Pixely, S. K. CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells. Neuron 8, 1191-1204 (1992).

[31] - Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. & Barres, B. A. Control of synapse number by glia. Science 291, 657-661 (2001).

[32] - Mauch, D. H. et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. Science 294, 1354-1357 (2001).

[33] - Haydon, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. Nature Rev. Neurosci. 2, 185-193 (2001).

[34] - Lino, M. K. et al. Glia-synapse interaction through Ca^{2+} permeable AMPA receptors in Bergmann glia. Science 292, 926-929 (2001).

[35] - Oliet, S. H. et al. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. Science 292, 923-926 (2001).

[36] - Smit, A. B. et al. Aglia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. Nature 411, 261-268 (2001).

[37] - Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. & Kriegstein, A. R. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409, 714-720 (2001).

[38] - Mivata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. & Ogawa, M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron 31, 727-741 (2001).

[39] - Lim, D. A. et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. Neuron 28, 713-726 (2000).

[40] - Bekkers, J. M. & Stevens, C. F. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. Proc. Nalt Acad. Sci. USA 88, 7834-7838 (1991).

[41] - Noble, M. & Mayer-Proschel, M. in Culturing Nerve Cells (eds Banker, G. & Golsin. K.) 499-544 (the MIT press, Cambridge, Massachusetts, 1998).

[42] - Schwartz, J. P. & Wilson. D. J. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex. Cerebellum. And striatum. Glia 5, 75-80 (1992).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

تعدُّد قدرات الخلايا الجذعية المتوسطية من منشأ نقوي بالغ*

ي. جيانغ وزملاؤه
معهد الخلايا الجذعية، جامعة مِنيسوتا. الولايات المتحدة الأمريكية.

ملخص

نعرض هنا خلايا معزولة مع خلايا جذعية متوسطية، دعيت بخلايا سلف بالغة متعددة القدرات (أو MAPCs) تمايزت في الزجاج، على مستوى خلية واحدة، ليس فقط إلى خلايا متوسطية بل أيضاً إلى خلايا بمواصفات خلايا أدمة وسطى حشوية، وخلايا أدمة ظاهرة عصبية وخلايا أدمة باطنة. تسهم الخلية السلف المتعددة القدرات، عندما تحقن في كيسة أرومية، في إعطاء معظم أنماط الخلايا الجسمية البالغة إن لم تكن جميعها. وعند استزراعها في مضيف غير مشعَّع تندمج فيه وتتمايز إلى سلالة مكوّنة للدم، بالإضافة إلى ظهارة كبدية ورئوية ومعوية. ويزداد الاندماج في جهاز توليد الدم والجهاز الهضمي عندما تستزرع MAPCs في مضيف مشعَّع قليلاً. ونظراً لكون الخلايا السلف المتعددة القدرات تتكاثر تكاثراً جيداً وبدونٍ شيخوخة مبكرة أو انخفاض في القدرة التمايزية، فإنها يمكن أن تكون مصدراً خلوياً ممتازاً لمعالجة الأمراض الوراثية والتنكسية.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية جنينية، تمايز خلوي، معالجة جينية.

تعدُّ الخلايا الجذعية الجنينية (ES) من مصدر كتلة الخلايا الداخلية للكيسة الأرومية خلايا متعددة القدرات pluripotent، وتستطيع التكاثر لزمن محدود بحالة غير متمايزة. تتمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES إلى السلالات الخلوية كافة في الحي in vivo، وتتمايز إلى العديد من أنماط السلالات الخلوية في الزجاج in vitro. وبالرغم من أن الخلايا الجذعية الجنينية قد أمكن عزلها من البشر [1] إلا أن استعمالها في أبحاث المعالجة يواجه اعتبارات أخلاقية [2]. توجد الخلايا الجذعية في أغلب النسج كالنسج المكوّنة للدم [3] والنسج العصبية [4]، والمعدية المعوية [5]، وظهارة الجلد [6]، والكبدية [7] والخلايا المتوسطية mesenchymal cells [8]. وتكون الخلايا الجذعية نوعية نسيج معين مقارنة بالخلايا الجذعية الجنينية ES أقل قدرة على التجديد الذاتي،رغم تمايزها إلى سلالات مُتعددة ، فهي ليست متعددة القدرات.

واعتُقد فيما سبق أن الخلايا الجذعية نوعية نسيج معين يمكن أن تتمايز فقط إلى نسيجها الأصل، غير أن دراسات حديثة أظهرت أن خلايا جذعية نوعية نسيج معين يمكن أن تتمايز إلى سلالات خلوية أخرى غير نسيجها الأصل. وبعد استزراع نقي عظم أو خلايا جذعية غنية بخلايا مكوّنة للدم (HSC)، اكتشفت خلايا مصدرها من المعطي وهي: أرومة خلايا عضلية هيكلية [9، 10]، وأرومة خلايا قلبية [11، 12] وأرومة ظهارية باطنة [11 – 14]، وظهارة كبدية وظهارة القناة الصفراوية، وظهارة رئوية، وظهارة الجهاز المعدي والمعوي [15 – 17]، وظهارة الجلد [18] وأرومة الظهارة العصبية [19 – 22]. وأظهرت بعض الدراسات أن خلايا جذعية عصبية [23، 24] وعضلية [25، 26] يمكن أن تتماير إلى خلايا مولدة للدم. وتعطي الخلايا الجذعية العصبية عندما تحقن في الكيسة الأرومة blastocyst عدداً من نسج جنين الفأر الشيميري chimaeric [27]، غير أن أغلب الدراسات لم تظهر بعد بصورة مقنعة أن خلية جذعية نوعية نسيج معين تتمايز إلى خلايا وظيفية لنسج مختلفة.

وقد ميّزنا خلية نادرة في مستنبتات خلوية لخلايا جذعية من اللحمة المتوسطية لنقي العظم البشري أمكنها الانتشار بالتضاعف لأكثر من 80 جيلاً. تتمايز هذه الخلية ليس فقط إلى سلالة خلوية متوسطية بل أيضاً إلى ظهارة بطانية [28، 29]، وأدمة داخلية [30]. ونظهر هنا أنه يمكن عزل خلايا قادرة على التمايز في الزجاج إلى الطبقات الجنينية المولدة الثلاث اعتباراً من نقي عظم قارض. تساهم هذه الخلايا في أغلب النسج الجسمية عندما تحقن في المرحلة المبكرة من الكيسة الأرومية وتطعَّم في الحي،حيث تتمايز إلى أنماط خلوية نوعية النسيج كاستجابة للأثر الممارس من قبل الأعضاء الأخرى.

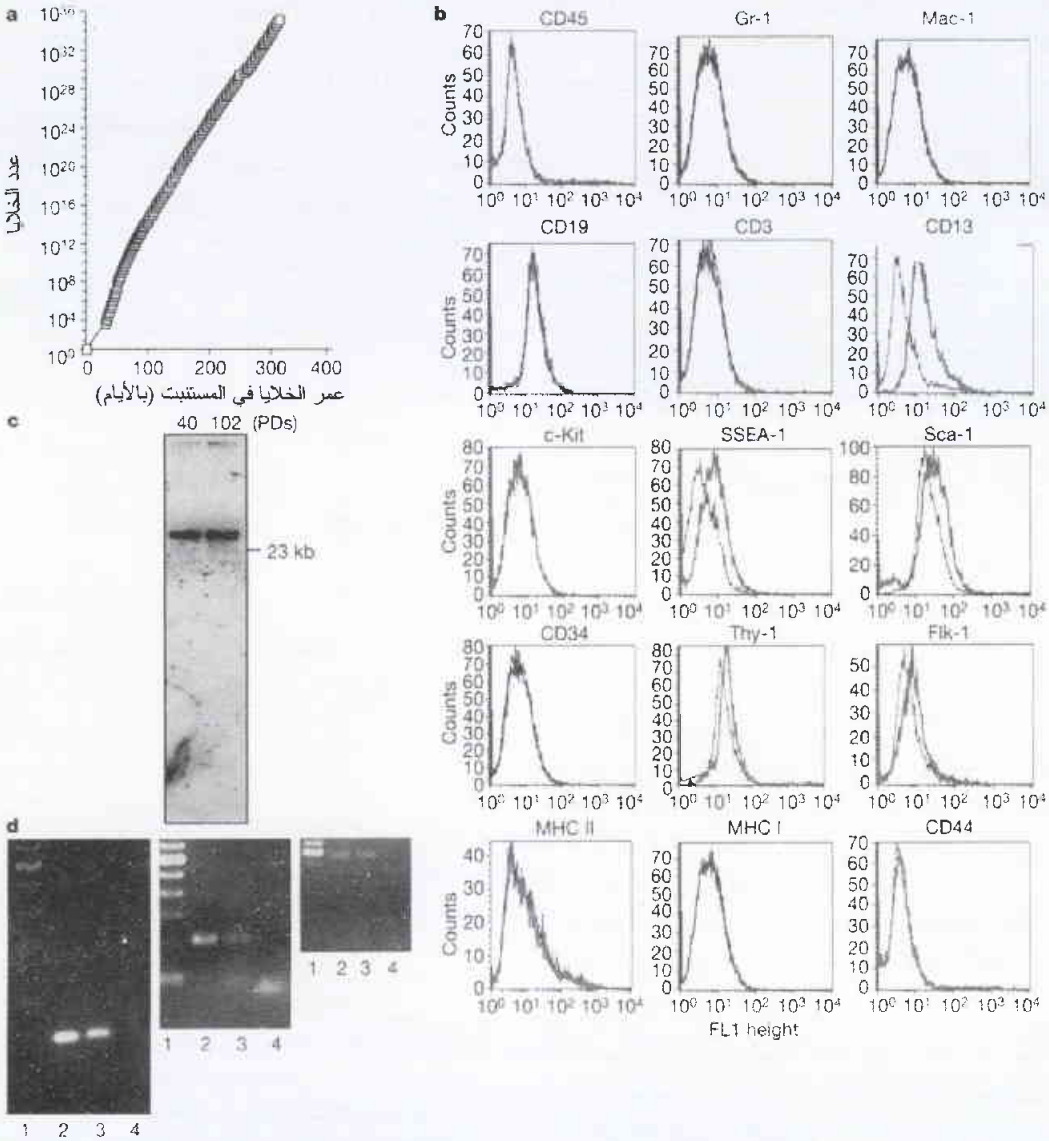
استنبات الخلايا السلف البالغة المتعددة القدرات غير المتمايزة من الفأر والجرذ

استخدمنا لعزل MAPCs من نقي عظم فأري طرائق مماثلة لتلك المستخدمة لمثيلتها البشرية MAPCs (h) [28]، غير أن MAPCs (m) الفأرية وليست hMAPCs البشرية، تتطلب العامل المثبط لابيضاض الدم (LIF) لنموها وانتشارها (ويمكن مطالعة الوصف الكامل لطريقة الاستنبات في جدول المعلومات الملحق رقم1). وقد استطعنا استنبات عدة جماعات من mMAPC الفأرية لأكثر من 120 بالتضاعف (الشكل 1a).

* نُشر هذا المقال في مجلة *Nature*, Vol 418, 4 July 2002. ترجمة الدكتور وليد الأشقر – هيئة الطاقة الذرّية السورية

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

ولايعرف النمط الشكلي لـ mMAPCs الفأرية في نقي العظم الطازج. ويتمثل النمط الشكلي لـ mMAPCs الفأرية المستنبتة بمعقد تمايزي CD34، CD44، CD45، C-KiT ،ومعقد توافق نسيجي كبير (MHC) من الصف الأول والثاني السلبيين؛ وتعبر mMAPCs الفأرية عن مستويات منخفضة من FLK-1 وSca-1 وThy-1، ومستويات عالية من CD13 والمستضد المرحلي النوعي I (SSEA-I) [1] (الشكل 1b). وكان النمط الشكلي والشكل متشابهين بعد 30 تضاعفاً خلوياً واستمر هذا حتى بعد التضاعف 120 (لمعلومات إضافية الشكل 1). ويشبه النمط الشكلي لـ mMAPC النمط الشكلي لـ hMAPC [28] لكنه يختلف عن الخلايا السلف المولدة للدم الفأرية بالقدرة على التمايز التحولي [11، 17، 18، 25].

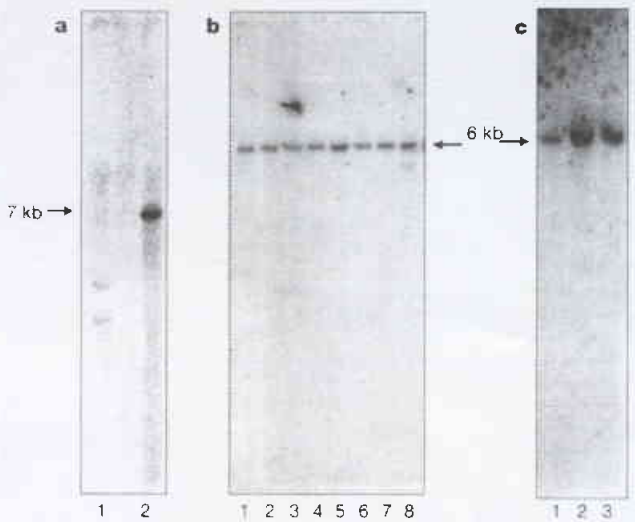


الشكل 1– صفات خلايا mMAPCs الفأرية: صُفحت خلايا BMMNCS لفأر بوجود EGF,PDFG-BB، و LIF على صفائح مغطاة بالـ FN. وبعد 3–4 أسابيع عزلت خلايا نمط CD45 /TER119 عن حبيباتها. وصُفحت بمعدل 10 خلايا في البئر على صفائح تحتوي على 96 بئراً مطلياً بـ FN وعلى الوسط نفسه. **a**- ثم نشرت الخلايا لزراعات جديدة عندما أصبحت بكثافة $0.5\text{-}1.5 \times 10^3 cm^{-2}$. وأحصي عدد الخلايا عند كل توزيع باستعمال عدادة دموية. **b**– وسمت خلايا mMAPCs المستنبتة حتى تضاعفت 120 مرة باستعمال أضداد مربوطة بـ FITC مضادة لـ CD45، Gr-1، Mac-1، CD19، CD3، CD13، c-KiT، SSEA-1، Sca-1، CD34، Thy-1، Flk-1، MHC، الصف الثاني (A^k-1) و MHC الصف الأول ($H\text{-}2K^k$)، CD44 أو أضداد شاهدة متماثلة النمط للغلوبولين المناعي immunoglobulin وحُلِّلت الخلايا باستعمال جهاز قياس خلوي بالتدفق من طراز FACS-Calibur. الخط الأسود: شاهد الغلوبولين المناعي، الخط الأحمر ضد محدد. **c**– طول القسيم الطرفي لمستنبتات mMAPCs تضاعفت 40 مرة (PDs) (العمود1) أو تضاعفت 102 مرة (العمود2) [28]. **d**- RT-PCR كمي لـ Rex-1 (على اليسار)، Oct4 (في الوسط) و β-actin (على اليمين). العمود1: شاهد الأوزان الجزيئية، العمود 2: خلايا جذعية جنينية ES، العمود 3: خلايا MAPCs، العمود 4: شاهد بدون قالب template، (انظر إلى الطرائق والمعلومات الإضافية في الجدول 1).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

وكانت mMAPCs بقطر 8-10 نانومتر مع نواة كبيرة وسيتوبلازما ضئيلة (لمعلومات إضافية الشكل 1a). وكان متوسط طول القسيم الطرفي telomere (ATL) في خلايا mMAPCs المستنبتة وبعد 40 تضاعفاً خلوياً مساوياً لـ 27 كيلو أساس (kb)؛ ولم يتغير طوله عندما أعيد قياسه بعد 102 تضاعف (الشكل 1c).

وحصلنا على نتائج مشابهة عندما عزلنا واستنبتنا خلايا MAPCs من نقي عظم جرذ من سلالة Sprague-Dawley (n=3). وكاثرنا rMAPCs) الجرذية لأكثر من 100 جيل بالتضاعف (لمعلومات إضافية انظر الشكل 2a). وتطلبت مستنبتات ناجحة لـ rMAPCs إضافة LIF إلى عامل النمو البشري (EGF) وعامل النمو الصفيحي المنشأ (PDGF) -BB. وكانت rMAPCs سالبة معقد التوافق النسيجي الكبير (MHC) من الصف الأول والثاني، وسالبة CD44 (بيانات غير معروضة)، وعبرت عن فعالية عالية لأنزيم التلوميراز، ولم تتقاصر التلوميرات في المستنبتات المدروسة بعد 100 تضاعف (لمعلومات إضافية الشكل 2b).



الشكل 2- مستنبتات من أصل خلية واحدة لخلايا mMAPCs الفأرية وrMAPCs الجرذية بُدِئَ فيها اعتباراً من عشر خلايا بالبئر، ونسلها المتمايز (انظر أيضاً المعلومات الإضافية في الجدول 2). خلّت خلايا BMMNCs الفأرية أو الجرذية المحورة باستعمال الفيروس القهقري [49] MSCV-eGFP، من خلايا $CD45^{-}TER119^{+}$، وأعيد توزيع خلايا إيجابية $eGFP^{+}$ بمعدل عشر خلايا بالبئر وتركت للتكاثر لأكثر من 100 جيل خلوي. هُضم دنا DNA من خلايا MAPCs أو من خلايا نسلها المتمايز (الشكل 3) لمدة ليلة كاملة باستعمال أنزيم EcoRI أو BamHI (قطع مرة واحدة في طليعة الفيروس MSCV-eGFP). فُصلت الشدف باستعمال الرحلان الكهربائي وثُبرت بمسبر eGFP cDNA الموسوم بـ ^{32}P. a- DNA مستخلص من تجمعات mMAPCs المتمايزة بعد تضاعفها 80 مرة إلى خلايا بطانية، وخلايا أدمة ظاهرية عصبية وخلايا كبدية (انظر الشكل 3). لوحظت غرزة فيروس قهقري وحيدة عند وزن 7 كيلو أساس. b- خلايا rMAPCs جرذية غير متمايزة (العمود 1) وسبع تحت مجموعات من خلايا rMAPCs بعد تضاعفها 75 مرة، وضعت في مستنبتات فرعية بمقدار 100 خلية وتركت للتضاعف 20 جيلاً خلوياً (المرات 2-8). لوحظت غرزة فيروس قهقري وحيدة عند وزن 6 كيلو أساس. c- خلايا rMAPCs لجرذ تركت لتتضاعف 85 مرة وتتمايز لتعطي خلايا بطانية (العمود 1)، والأدمة الظاهرية العصبية (العمود 2)، والكبدية (العمود 3)، ولوحظت غرزة فيروس قهقري عند وزن 6 كيلو أساس.

وما وجدناه لدى القوارض من ضرورة إضافة LIF إلى وسط استنبات خلايا MAPC، لا كما لدى الخلايا MAPCs البشرية، يشبه النتيجة التي حصلنا عليها في الخلايا الجذعية الجنينية ES، ويبدو أن الخلايا الجذعية الجنينية ES البشرية لا تعتمد على LIF [31]، بينما تحتاج الخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية إلى LIF لتنمو خارج الحي [32]. وأظهر تفاعل البوليميراز السلسلي النسخي العكسي الكمي (Q-RT-PCR) أن عاملي نسخ مهمّين لاستمرار عدم تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ES هما Oct-4 [33] و Rex-1 [34] عُبِّر عنهما في خلايا MAPCs الفأرية؛ حيث كان Rex-1 بمستويات مشابهة للخلايا الجذعية الجنينية ES الفأرية وOct-4 أخفض بـ 1000 مرة من مستوياته في الخلايا الجذعية الجنينية ES (الشكل 1d).

تمايز mMAPCs و rMAPCs مفردة في الزجاج

أعطى حوالي 1% من الآبار المزروعة بعشر خلايا نقوية وحيدة النواة (BMMNCs) من النمط، -CD 45 -TER 119، مستنبتات مستمرة النمو. ويشير هذا إلى أن واحدة من 1,000 من خلايا BMMNCs CD45- TER 119 قادرة على إبداء مستنبتات MAPC، ويشير أيضاً إلى أن النسل الناتج من عشر خلايا ينحدر ربما من خلية واحدة. ولنثبت إثباتاً قاطعاً أن خلية واحدة تعطي مستنبتات مستمرة النمو ونسلاً متمايزاً، استخدمنا طريقة الوسم بفيروس قهقري (الشكل 2: انظر أيضاً المعلومات الملحقة في الجدول 2)

وبعد إجراء مستنبتات فرعية بمعدل عشر خلايا في بئر، اختيرت جماعات خلوية تعبر عن بروتينات مفلورة مدعمة خضراء، ثلاث جماعات فأرية، وجماعتان جرذيتان ($eGFP^{+}$)، وتركت ليتوسع المستنبت لأكثر من 100 تضاعف. استمرت الخلايا في المستنبتات (100%) في التعبير عن GFP بعد انتشار الخلايا المستنبتة. أظهرت تحاليل الترحيل بطريقة Southern blot أن قطعة الفيروس القهقري المغروزة كشفت في واحدة من جماعات mMAPC الفأرية وواحدة جرذية rMAPC ناشئة من عشر خلايا بدئية (الشكل 2). ولوحظت القطعة الفيروسية المغروزة نفسها في سبع تحت مستعمرات من جماعة خلوية rMAPC، وهذا يظهر أن نسل خلية mMAPC الفأرية أو rMAPC الجرذية نقل إليه فيروس قهقري يعبر عن eGFP أعطى جماعات خلوية ذات نمو مستمر [35، 36].

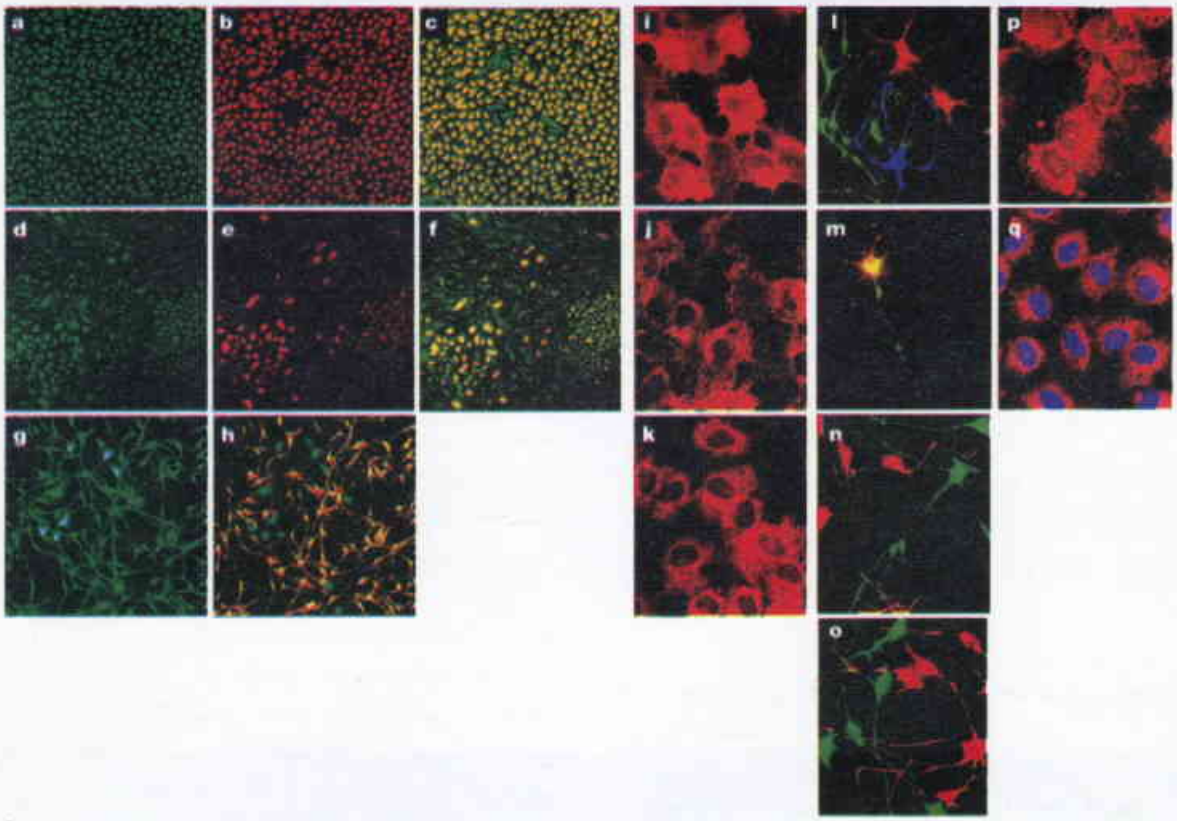
وسلسلنا الجينوم بالتوجه إليه من المنطقة 3 للفيروس القهقري باستعمال طريقة PCR (Splin kerette)، والذي يكشف غرزة فيروسية قهقرية واحدة في عدد قليل من الخلايا 5×10^{3} خلية [37]. كما كشف موقع غرزة فيروسية قهقرية واحدة في جماعة خلوية فأرية mMAPC وأخرى جرذية rMAPC (لمعلومات إضافية انظر الجدول 2). وثبت وجود جوار المنطقة باستعمال مرئسة PCR المصمّمة في فيروس الخلايا الجذعية الفأرية (MSCV) في التسلسل التكراري النهائي الطويل (LTR) وفي تسلسل 3 للجينوم المجاور genomic flanking للموقع المغروز.

واختبرنا فيما بعد القدرة التمايزية في الزجاج لـ mMAPCs الفأرية وrMAPCs الجرذية بإضافة سيتوكينات مختارة على أساس أنها وصفت

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

بقدرتها على توجيه تمايز hMAPC البشرية أو الخلايا الجذعية الجنينية ES إلى الأُرومة الوسطى، والأُرومة الظاهرة العصبية والأُرومة الباطنية. ويتطلب التمايز أن يعاد تصفيح (فرش) الخلايا في أوعية الاستنبات بكثافة خلوية $1\text{-}2\times10^4$ خلية/ cm^{-1}، وفي وسط استنبات خالٍ من السيروم وEGF وPDGF-BB وLIF لكن بوجود سيتوكينات نوعية بالسلالة المستعملة. أجريت دراسات باستعمال سلالتين خلويتين منحدرتين انحداراً منفصلاً من ROSA26، وسلالتين C57BL/6 وجمهرة خلوية MAPC للجرذ مكاثرة من 40–120 جيل تضاعف خلوي، بالإضافة إلى خلايا نسيلية فأرية mMAPCs منقولة eGFP (مكررة بعد 50، 80 و 120 جيل تضاعف خلوي)، وخلايا نسيلية جرذية rMAPCs (مكررة بعد 50و 80 جيل تضاعف خلوي). وتشابه التمايز عندما استخدمنا مستنبتات الـ MAPCs بمرحلة الأربعين إلى أكثر من 100 جيل تضاعف خلوي. ولم تلاحظ فروق بين الخلايا منقولة eGFP وغير منقولته. وأغلب البيانات المذكورة هي لذلك من خلايا mMAPCs نسيلة $eGFP^+$ (الشكل 3) ونسيلة $eGFP^+$ rMAPCs (الشكل 3).

وكمثال على الأُرومة الوسطى، تمكّنا من تحريض التمايز إلى الأدمة الباطنة، وكانت خلايا mMAPCs أو rMAPCs سلبية لصفوف التمايز CD31، وCD62E أو عامل فون ويلبراند (vWF) (بيانات غير معروضة)، وعبّرت عن مستويات منخفضة من FLK-1 (الشكل 1b). وعندما استنبتت خلايا mMAPCs الفأرية (الشكل 3) أو خلايا rMAPCs الجرذية (الشكل 3) بوجود الفيبرونكتين (FN)، و10 نانوغرام /مل من عامل نمو بطانة الأوعية الدموية B–(VEGF) لمدة 14 يوماً. تمكن أكثر من 90% من خلايا MAPCs من الوصول للنمط الظاهري لبطانة الأوعية الدموية، وعبّرت عن صفوف التمايز CD31، FLK-1، vWF. وعبّرت جميع الخلايا المتلوّنة إيجابياً من أجل vWF أيضاً عن eGPF، بينما بقيت في المستنبت جماعة خلوية صغيرة من خلايا مشابهة للأرومة الليفية موجبة eGBF وغير ملوّنة من أجل vWF (الشكل 3a-h).



الشكل 3– تمايز خلايا mMAPCs الفأرية في الزجاج إلى خلايا بطانية وأدمة ظاهرة عصبية وأدمة باطنة. **a-h**، نسيلة خلايا mMAPC's تمط eGFP إيجابي ومعالجة لمدة 14 يوم بـ VEGF **(a-c)**، HGF + FGF-4 **(d-f)** أو بـ bFGF **(g-h)**. لونت مستنبتات بضد vWF الموسوم مع Cy3 **(b)**، وضد الألبومين الموسوم بـ Cy3 **(e)**، وضد GFAP الموسوم بـ Cy5 **(g)** أو بضد NF200 الموسوم بـ Cy3 **(h)**. تُظهر الأجزاء h، g، f، c، فائض تلون من Cy3 أو Cy3 مع eGFP. تظهر الأجزاء h، g، f، d، c، a أن 100% من الخلايا كانت إيجابية $eGFP^+$ (تكبير 10 مرات). وفي الأجزاء **i-k**، عولجت خلايا mMAPCs الفأرية إيجابية eGFP مع VEGF لمدة 14 يوماً لوّنت بأضداد مضادة لـ CD31-Cy3 **(i)**، Flk-1-Cy3 **(j)**، أو بـ vWF-Cy3 **(k)** (تكبير 60 مرة). الأجزاء **l-o**، لوّنت خلايا mMAPc من ROSA21 المعالجة بـ bFGF لمدة 14 يوماً بأضداد تجاه GFAP-Cy3، وNF200 الموسوم بـ FITC وضد GalC-Cy5 **(l)** (تكبير 20مرة). وكبديل لوّنت خلايا mMAPCs الفأرية من ROSA26 المعالجة على التتابع مع bFGF، FGF-8 و BDNF باستعمال الأضداد مضادة لـ MAP2-Cy3 والضد Tau الموسوم بـ FITC **(m)**، وبـ GABA CY3 و DDC الموسوم بـ FITC **(n)**، أو TH-Cy3 والسروتونين الموسوم بـ FITC **(o)** (تكبير 40 مرة). **q.p**، خلايا mMAPCs الفأرية إيجابية $eGFP^+$ المعالجة بـ FGF-4 و HGF لمدة 14 يوماً لوّنت بأضداد ضد CK18–Cy3 **(p)** أو الألبومين Cy3 و HNF1-Cy5 **(q)** (تكبير 60 مرة). الألوان الظاهرة: Cy3، الأحمر؛ FITC، الأخضر؛ Cy5، الأزرق؛ الإيجابية المضاعفة لـ FITC و Cy3، أصفر. من الجزء **q** المنطقة النووية إيجابية من أجل HNB1-Cy5 وإيجابية ضعيفة من أجل Cy3 تعطي أرجواني التكبير: **a-h**، 10 مرات؛ **i-k**، 60 مرة؛ **l**، 20 مرة؛ **m-o**، 40 مرة؛ **p**، **q**، 60 مرة.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

الجدول 1- درجة الشيميرية بعد حقن خلايا **MAPC** من سلالة **ROSA26**.

MAPCs per blastocyst	Litters born	No. of pups born	Neo-positive by Q-PCR (%)				
			0	1–10	10–20	20–40	>40
10–12	4 of 11	22	5 of 22 (23%)	13 of 22 (59%)	2 of 22 (9%)	1 of 22 (4.5%)	1 of 22 (4.5%)
1	3 of 5	15	8 of 15 (53%)	5 of 15 (33%)	0 of 15 (0%)	0 of 15 (0%)	2 of 15 (13%)

حقنت خلية واحدة و 10–12 خلية MAPCs من سلالة ROSA26 في كيسات أرومية من سلالة C57 BL/6 بعمر (116و383.5 يوم) على التتابع نقلت الكيسات الأرومية إلى 16 أماً حاضنة وتركت الفئران لتتطور وتلد سبعة بطون. وتنوّع عدد الصغار في كل بطن من 1 إلى 8 وقيست الشيميرية بعد 4 أسابيع بمقارنة مستويات Neo/ β-gal من جزء من ذيل حيوانات بعمر 4 أسابيع بتلك المأخوذة من نسج فئران ROSA26 باستعمال PCR الكمي. حُضّر الدنا DNA بطرائق معيارية، وخضعَ إلى 40 دورة تضخيم كما هو مشار إليه في الشكل 1 واستعملت المرئسات التالية: Neo: 5' -TGGATTGCACGCAGGTTCT-3' و5' -TTCGCTTGGTGGTCGAATG-3' وحُدّدت النسبة المئوية للشيميرية بمقارنة عدد نسخ تعليمات المصنع (7700 ABI PRISM Detector Software 1.6).

ويمكن تنمية وإكثار الخلايا السلف العصبية باستعمال PDGF-BB وتحريضها على التمايز بإزالة PDGF وإضافة عامل نمو الأرومة الليفية الأساسي bFGF [38]. استنبتنا لذلك خلايا mMAPCs الفأرية (الشكل 3) و rMAPCs الجرذية (لمعلومات إضافية انظر الشكل 3) في آبار مطلية بـ FN وبدون PDGF-BB وEGF ولكن بوجود 100 نانوغرام/مل من bFGF [38]. وبعد 14 يوماً، اكتسبت 15±4% من خلايا MAPCs الشكل والنمط الظاهري للخلايا الدبقية النجمية (بوجود البروتين الليفي الحامضي الدبقي) ($GFAP^+$)، و12±3% منها نمط خلايا دبقية قليلة التغصنات (غالاكتوسيريبروزيد $GalC^+$) و68±9% منها نمط العصبونات (ليف عصبي -200 إيجابي $NF\text{-}200^+$). ولم نجد أبداً NF-200 وGFAR أو GalC في الخلية نفسها. وقد وُسم أكثر من 90% من خلايا تبدي $eGFP^+$ بواسمات الأدمة الظاهرة العصبية. وقد أكّد اختبار RT-PCR الكمي لخلايا mMAPCs المعالجة بـ bFGF تعبيرية مورثات الأدمة الظاهرة العصبية (لمعلومات إضافية انظر الجدول 3). وترتفع مستويات RNA الخاص بـ Otx2 بعد الاستنبات بوسط محتوٍ على bFGF لأكثر من 50 ضعفاً بنهاية اليومين الأولين ثم يصل حده الأعظمي بعد 5 أيام. وفي اليوم الرابع ارتفع معدل ضبط تركيب mRNA الخاص بـ Otx1 حتى 3–5 أضعاف، وارتفعت في اليوم الخامس مستويات mRNA كل من Pax2، وPax5 وnestin، ووصلت إلى مابين 400–800 ضعف أعلى مما هي عليه في خلايا mMAPCs الفأرية غير المتمايزة [39]. وبالنتيجة، عندما استنبتت خلايا mMAPCs الفأرية بوسط محتوٍ على 100 نانوغرام/مل من bFGF، و10 نانوغرام/مل FGF-8، و10 نانوغرام/مل من العامل المغذي العصبي الدماغي المنشأ (BDNF) لوحظ وجود نمط ظاهري ناضج أكثر (الشكل 3i-q)، وعبّرت 30% من الخلايا عن واسمات العصبونات المحتوية على الدوبامين (دوبا دي كاربوكسيلاز (DDC) والتيروزين هيدروكسيلاز $(TH)^+$)، وعبّرت 20% أخرى عن واسمات العصبونات المحتوية على السيروتونين (إيجابي السيروتونين)، وعبّرت 50% الأخيرة عن عصبونات محتوية على حمض الأمينوبوتيرك - غاما (GABA- إيجابي). وأصبحت الخلايا شبيهة العصبونات مستقطبة لأن Tau وMAP2 قد ظهر تعبيرهما في الجزء المحوري والمتغصن الجسمي على التتالي (الشكل 3m).

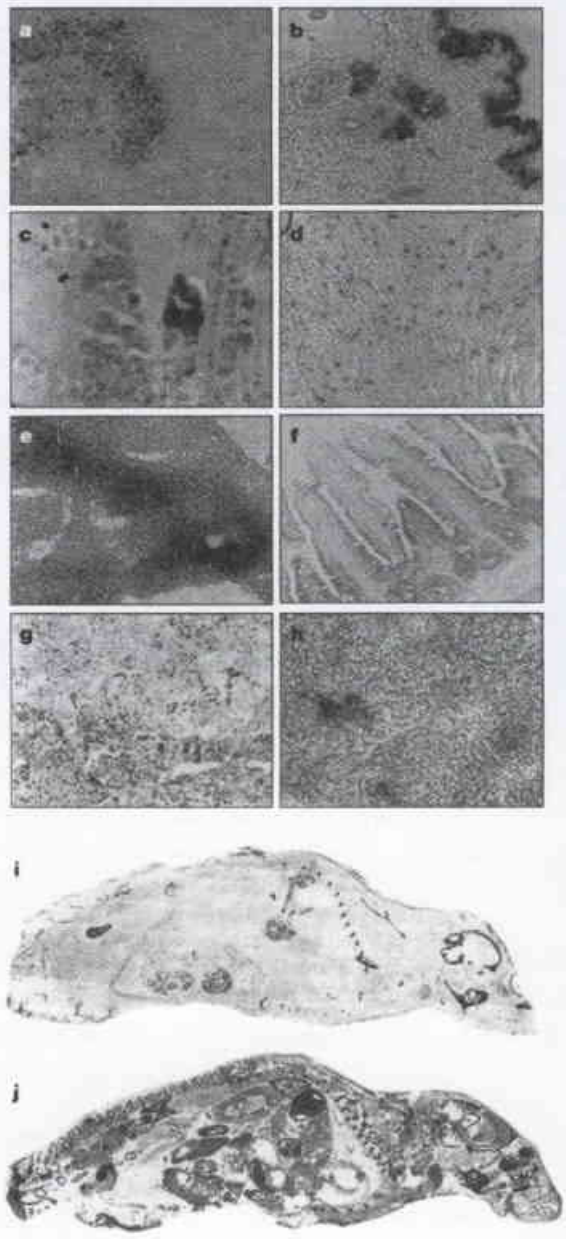
واختبرنا بعدها فيما إذا تمايزت خلايا mMAPCs الفأرية (الشكل3)، أو خلايا rMAPCs الجرذية إلى خلايا أدمة باطنية (لمعلومات إضافية انظر الشكل 3).وكما هو موصوف وصفاً مستفيضاً في [30]، وعندما أعيد نشر الخلايا على عبوات استنبات جديدة من مادة الماتري جيل matrigel مع 10 نانوغرام/مل من مادة FGF-4 و20 نانوغرام/مل من عامل نمو الخلايا الكبدية (HGF)، اكتسبت حوالي 60% من mMAPCs الفأرية (الشكل 3a-h) أو rMAPCs الجرذية شكلاً شبه ظهاري epithelioid، وأصبحت 10% من الخلايا ثنائية النوى. وتلوّنت 60% من الخلايا إيجابياً للألبومين والسيتوكيراتين 18(CK)، وHNF-1 ونعرض في الشكل 3a-h أن جميع الخلايا الملونة إيجابياً بـ CK18 كانت أيضاً إيجابية لـ $eGFP^+$، وقد أظهرنا مؤخراً أن لهذه الخلايا شبه الظهارية مواصفات وظيفية للخلايا الكبدية بما فيها إنتاج البولة، والألبومين، وP450 القابل للتحريض بالفينوباربيتال، وتوليد الغلوكوز وأخذ ليبوبروتين منخفض الكثافة [30].

أظهرت تحاليل الترحيل بطريقة تبقّع سوثرن وتفاعل البوليميراز السلسلي للمنطقة المجاورة للغرز أن خلايا mMAPCs وrMAPCs المتمايزة إيجابية $eGFP^+$ احتوت على غرزة فيروس قهقري واحدة المصادفة في خلايا MAPCs غير المتمايزة (الشكل 2 ولمعلومات إضافية انظر الجدول2). ولما كانت 100% من الخلايا المتمايزة إيجابية $eGFP^+$ (الشكل 3a-h) وموجودة فيها غرزة فيروس قهقري واحدة فقط، فإن هذه الدراسات تظهر أن خلية MAPC واحدة تتمايز إلى خلايا ذات شكل خارجي ونمط ظاهري ومواصفات وظيفية تمثل خلايا الطبقات الجنينية الأصل الثلاث.

خلايا جذعية من مصدر MAPCs واحد تسهم بإعطاء معظم النسج الجسمية.

ولنحددَ أكثر مدى تمايز خلايا MAPCs، قسنا قدرتها على إعطاء نسج مختلفة بإدخال خلايا MAPCs في كيسة أرومية مبكرة. فحصلنا على خلية أو 10–12 خلية MAPCs من ROSA26 بعد 55–65 تضاعفاً خلوياً، وحقنت مجهرياً في كيسات أرومية عمرها 3.5 يوم من سلالة فأر C57BL/6. ونقلت الكيسات الأرومية إلى أمهات مربيات وسمح للفئران بالتطور والولادة (الجدول1). وكان عدد البطون المولودة وعدد الحيوانات بالبطن متوافقاً مع معدل الولادة الذي لوحظ في دراسات أخرى خلال هذه الفترة. وكانت الحيوانات المولودة بطريقة الحقن المجهري في الكيسات الأرومية مماثلة بالحجم للحيوانات الطبيعية ولم تظهر عليها تشوهات صريحة.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy



الشكل 4- كشف الشيميرية باستعمال التلوين X-gal و ضد β-gal في حيوانات ناتجة من كيسات أرومية حقنت مجهرياً بـ خلايا جذعية ROSA26 MAPC (انظر أيضاً الجدول 1 ولمعلومات إضافية انظر الشكل 4). **a-h** صور لأعضاء مفردة لونت بـ X-gal في فأر شيميري بنسبة 45%، حدد باستعمال PCR الكمي من أجل Neo في جزء من الذيل. وكانت المقاطع النسيجية من: الدماغ (**a**)، الجلد (b)، عضلة هيكلية (c)، عضلة قلبية (d)، الكبد (e)، الأمعاء الدقيقة (f)، الكلية (g)،الطحال (h). i-j صور من مقطع ملون X-gal خلال فأر غير شيميري (i) أو كان 45% شيميري (j) تكبير 20 مرة.

قدّرت الشيميرية بمقارنة سويات Neo/β-Gal [40] في مقاطع ذيل حيوانات بعمر 4 أسابيع بنسيج فأري من ROSA26 باستعمال Q-PCR. ويمكن كشف الشيميرية في 80% من الفئران الناشئة من الكيسات الأرومية التي حقن فيها 10-12 خلية mMAPCs فأرية، وفي 33% من الفئران الناشئة من الكيسات الأرومية المحقونة مجهرياً بخلية جذعية واحدة mMAPC فأرية (الجدول1). وفي هاتين المجموعتين من الحيوانات، تراوحت الشيميرية بين 0.1% إلى 45%. ويمكن أن يشير غياب الشيميرية في بعض الكيسات الأرومية المحقونة مجهرياً إلى أن خلايا mMAPCs الفأرية لم تكن متجانسة تماماً.وبالمقابل، يمكن أن تكون المشاكل التقنية المرافقة لحقن خلية واحدة مسؤولة عن فشل 66% من الخلايا mMAPCs الوحيدة التي يفترض أن تسهم في تطور فأر.

ضُحّي بالحيوانات بعد 6-20 أسبوعاً، وجمّد عدد من الفئران في الآزوت السائل، وقطعت مقاطع رقيقة لكامل الفأر كما هو موصوف في [41]، ولوّن باستعمال 5-برومو-4 كلورو-3-إندوليل -β-D غلوكوزيد (X-gal). ويعرض في الشكل 4i حيوان تمثيلي غير شيميري، كما هو محدد باستعمال تحليل tail clip، وهو ناشئ من كيسة أرومية حقنت فيها خلية MAPC واحدة. ولم يلاحظ تلوّن X-gal. وبالمقابل ساهم الحيوان في الشكل 4j الشيميري بنسبة 45% باستعمال تحليل tail clip، وفي عدة نسج جسمية بدءاً من خلية MAPC وحيدة ناشئة من ROSA26.

وجمعنا أيضاً أعضاء متعددة منفصلة، وحددنا وجود خلايا ناشئة من خلايا mMAPCs فأرية بالتلوين (X-gal) (الشكل 4 a-h)، والتلوين باستعمال أضداد ضد β-gal فلوريسيئين إيزوثيوسيانات (FITC) (الشكل 5). وساهمت الحيوانات الشيميرية التي تملك خلايا Neo/β-Gal^{+} إيجابية كما حدد باستعمال الـ PCR في تحليل tail clip، بالخلايا الجذعية MAPC والناشئة من ROSA26 لعدة نسج، ومنها الدماغ والشبكية (غير معروضة)، والرئتان، والعضلة القلبية، والعضلة الهيكلية، والكبد، والأمعاء، والكلية، والطحال، ونقي العظم، والدم (غير معروضة) والجلد (كما هو مشار إليه باستعمال تلوين X-gal الشكل 4a-h انظر أيضاً لمعلومات إضافية الشكل 4). وعبّرت خلايا β-gal^{+} عن واسمات نمطية النسج التي دمجت فيها. فخلايا β-gal^{+} في نقي العظم والطحال والدم تشترك بالتلوّن من أجل المستضدات CD45, Gr-1, Mac-1, CD19، و CD3 (الشكل 5). وبسبب وجود شيميرية مولّدة للدم استخدمنا التلوين المناعي الوميضي ثلاثي الألوان لنتأكد من أن خلايا β-gal^{+} في الأعضاء الصلبة لم تكن إلا مجرد خلايا مولدة للدم.

تشترك خلايا إيجابية β-gal^{+} بالتلون لـ Pan-CK في الرئتين مع المعي، ولـ CK18 في الكبد (الشكل 5). كما كشفنا خلايا تبدي CD45^{+} الإيجابي أو CK^{-} السلبي و β-gal^{+} الإيجابي في هذه الأعضاء. لكن لم نلاحظ أي خلية فيها تشارك لونيٌ إيجابي للمستضدات الثلاثة معاً (β-gal, CD45, CK). وتتشارك خلايا β-gal^{+} الإيجابية لونياً من أجل الديستروفين dystrophin في العضلات الهيكلية والتروبونين -I في العضلة القلبية (الشكل 5). وأعطت خلايا إيجابية β-gal^{+} العصبونات (Neu-N^{+}) والخلايا النجمية (GFAP^{+}) في أرجاء كامل الدماغ بما فيها القشرة، والجسم المخطط striatum، والحصين hippocampus، والمهاد thualamus والمخيخ cerebellum (الشكل 5).

وفي القشرة المطوقة كانت العصبونات والخلايا النجمية إيجابية β-gal^{+} موجودة، في حين وجد في الجسم الثفني corpus callosum السفلي خلايا نجمية β-gal^{-} وخلايا متفق أنها دبقية قليلة التغصنات.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الجدول 2- مستويات انغراز في فئران NOD/SCID مزروعة بخلايا جذعية MAPCs من سلالة ROSA26.

الحيوان	الزمن (بالأسابيع)	الإشعاع	مستويات الانغراز (%) نقي العظم	الدم	الطحال	الكبد	الرئة	المعي
1	4	No	2 (1)	2	5	7	4	2
2	5	No	3 (4)	4	5	9	5	3
3	10	No	1	3	3	6	3	2
4	16	No	4	2	3	4	3	4 (4.9)
5	24	No	3	2	3	6	4	1
6	8	Yes	5 (6)	6	4	5	2 (1.1)	7
7	8	Yes	10	8	7 (7.3)	4	5	9
8	8	Yes	5	6	3	5	5	6
9	8	Yes	7	5	5	6	4	6
10	10	Yes	5 (6)	7	9 (12.5)	5	2	8
11	11	Yes	8	8	6	5	3	10 (11.9)
12	11	Yes	6	5	4	8 (6.2)	10 (12.3)	6
SR-1	7	Yes	6	7	5	1 (1.7)	5	8
SR-2	10	Yes	5	4	8	3	4	6

حُددت مستويات الانغراز باستعمال التفلور المناعي أو PCR الكمي. حُقنت 10^6 خلية جذعية MAPC من ROSA26 في أوردة فئران NOD/SCID بأعمار 6-8 أسابيع وتمت متابعتها بحسب دليل IACUC. وكانت الفئران المتقبلة غير مشعّعة أو مشعّعة باستعمال 250 سنتي غراي (بمعدل جرعة 57 سنتي غراي/دقيقة من منبع سيزيوم Mark1) قبل 16-24 أسبوعاً من الحقن. ضُحّي بالحيوانات بعد 4-24 أسبوعاً ودرست الأعضاء باستعمال PCR الكمي من أجل Neo (بين قوسين) وباستعمال الكيمياء المناعية النسيجية (انظر الشكل 6). ومن أجل SR-1 وSR-2، جمع نقي عظم الحيوانين 9 و10 وازدرعت 1.5×10^7 خلية في مستقبل ثانوي.

وفي الحصين كانت أغلب الخلايا الحبيبية للتلافيف المسننة، والخلايا الهرمية في النقير إيجابية $\beta\text{-gal}^+$ ومنتشرة مع خلايا نجمية إيجابية $\beta\text{-gal}^+$ وناشئة من MAPC.

وأُشير إلى أنه بعد حقن خلايا جذعية عصبونية ناشئة من ROSA26 في كيسة أرومية فأرية وجدت خلايا عبّرت عن LacZ بدرجات مختلفة، ليس فقط في الدماغ بل أيضاً في بعض نسج الأدمة الوسطى والداخلية في جنين فأر شيميري [27].أكدت نتائجنا مدى أهمية هذه الدراسات، وكما نعرض أن خلايا MAPCs وحيدة أنشأت شمائر متوازنة، وهذا يؤدي إلى المساهمة في إعطاء أغلب أنماط الخلايا الجسمية، وأن هذه الشيميرية يمكن أن تلاحظ ليس فقط في أجنة فئران بل أيضاً في فئران كانت بأعمار 6-20 أسبوعاً. وقد وجدت، بالإضافة إلى ذلك، بعض الخلايا إيجابية $LacZ^+$ في المناسل، ولم نجر حتى الآن تجارب التكاثر لنختبر فيما إذا كانت خلايا MAPCs تسهم في إنشاء سلالة منشئة.

تطعيم خلايا mMAPCs الفأرية، وتمايزها في خلايا نوعية نسيج

اختبرنا لاحقاً إمكانية ارتشاح خلايا mMAPCs عبر أوردة في طعوم الحيوانات بعد الولادة وتمايزها في خلايا نوعية نسيج. ولتجنب رفض الطعم من قبل الحيوانات الحاضنة، حقنت خلايا MAPCs من السلالة ROSA26 غير المتمايزة عبر الوريد الذيلي في حيوانات حاضنة مشعّعة أو غير مشعّعة بجرعة (250 سنتي غراي) وعمرها 6-8 أسابيع، غير بدينة أو سكرية وفيها عوز مناعي شديد ومركب (NOD/SCID). واختبرت طعوم خلايا محتوية على β-gal/Neo باستعمال الكيمياء النسيجية المناعية (من أجل β-gal)) و PCR الكمي من أجل (Neo) بعد 4-24 أسبوعاً من التطعيم (الجدول2 والشكل6). ولوحظت خلايا الطعوم المحددة كأكثر من $1\%\ \beta\text{-gal}^+$ باستعمال تقانة الفلورة المناعية و/أو PCR- الكمي في النسج المولدة الدم (الدم، نقي العظم، الطحال)، وظهارة الرئتين، والكبد والأمعاء لكافة الحيوانات الحاضنة وكان ذلك مماثلاً في الحيوانات المدروسة بعد 4 أو 14 أسبوعاً من الازدراع.

تتشارك خلايا إيجابية $\beta\text{-gal}^+$ في نقي العظم والطحال بالتلوّن لـ CD45 (الشكل 6). وتتشارك 38% إلى 62% من خلايا نقي العظم إيجابية $\beta\text{-gal}^+$ بالتلوّن لـ Gr-1، و9-27% لـ Mac-1، و18-31% لـ CD19 و4-11% لـ TER119 (الجدول 4). ولوحظت نتائج مشابهة من أجل الدم (بيانات غير معروضة). ولم تلاحظ خلايا T إيجابية $\beta\text{-gal}^+$ و$CD3^+$ في الدم، ونقي العظم، والطحال بالرغم من أن خلايا تائية إيجابية $\beta\text{-gal}^+$ و $CD3^+$ كانت موجودة في الفئران الشيميرية. إن سبب هذا غير معروف. يحدث تطعيم ضمن الطحال غالباً كعناقيد من خلايا (المعطي)، و يتوافق ذلك مع الفرضية القائلة بأن خلايا MAPCs التي تستوطن الطحال تتكاثر مكانياً، وتتمايز لتشكل مستعمرات من خلايا المانح وتتشابه مع المستعمرات المشكلة لوحدة الطحال (CFU-S).

ولايمكن إرجاع تمايز خلايا mMAPCs الفأرية إلى خلايا مولدة الدم لتلوث mMAPCs بخلايا HSC. وقد فصدت BMMNCs من خلايا $CD45^+$ بانتخاب على عامود قبل بدء استنبات MAPC. وتعدّ خلايا MAPCs سلبية CD3, Gr-1, Mac-1, CD19, CD34 و CD45 (الشكل 1)، ويعبر عن عامل الترجمة المبكر للأدمة الوسطى والخلايا مولدة الدم، بما في ذلك قصير الذيل brachyury، وGATA-2 وGATA-1 [42]، في خلايا mMAPCs (معلومات منظومة الـ DNA غير معروضة).

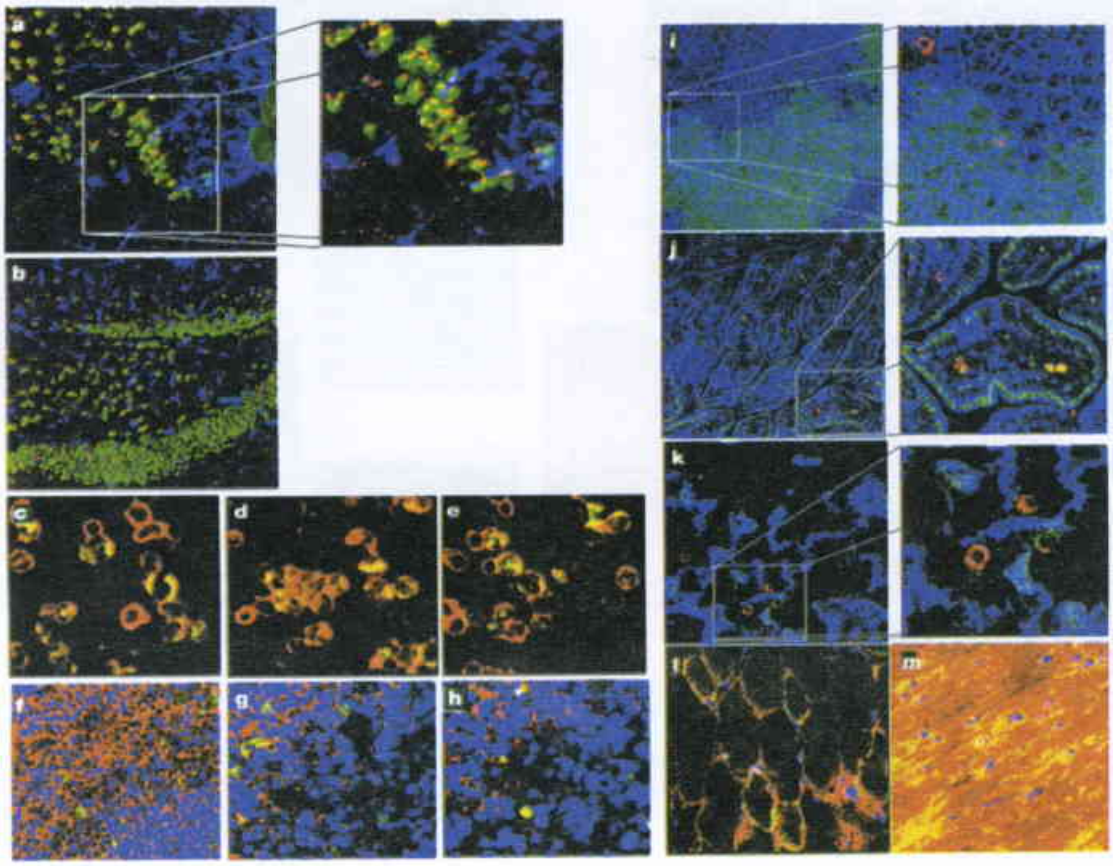
علاوة على ذلك، لم تنفع شروط الاستنبات المستعملة لـ mMAPCs الفأرية في HSC (الخلايا الجذعية البشرية)، وباءت كافة المحاولات بالفشل لتحريض تمايز الخلايا مولدة الدم اعتباراً من hMAPCs في الزجاج حتى هذا التاريخ.

لوحظت طعوم mMAPC الفأرية كذلك في الكبد، والأمعاء والرئتين (الشكل6). وبسبب الطعوم المولدة للدم استعملنا طريقة التلوين المناعي النسيجي ثلاثي اللون على المقاطع النسيجية نفسها للتمييز بين الخلايا الظهارية والخلايا المولدة للدم.

وشكّلت الخلايا من نمط $\beta\text{-gal}^+$ و $CK18^+$ و$CD45^-$ أو الخلايا نمط $\beta\text{-gal}^+$ والألبومين الإيجابي حبالاً من الخلايا الكبدية، وشغلت من 5 إلى 10% في مقطع ثخنه 5 نانومتر محيطة بالمسارات البابية، ويلاحظ هذا النمط أثناء الترميم الكبدي بدءاً من الخلايا الكبدية البيضوية الشكل [7، 15].

ويتناغم نمط الطعم الملاحظ تجريبياً، بالتضافر مع أن 5 إلى 20 فقط من المقاطع تحتوي خلايا المعطي، مع الفكرة القائلة أن الخلايا الجذعية تنغرس في بعض المناطق وليس في كل مناطق الكبد، حيث تتكاثر وتتمايز إلى خلايا كبدية. وبالرغم من تمييز خلايا إيجابية الـ $CD45^+$ في بعض المقاطع، فإنه لم تلاحظ خلايا ملونة إيجابياً من أجل CD45 والـ CK18 معاً.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

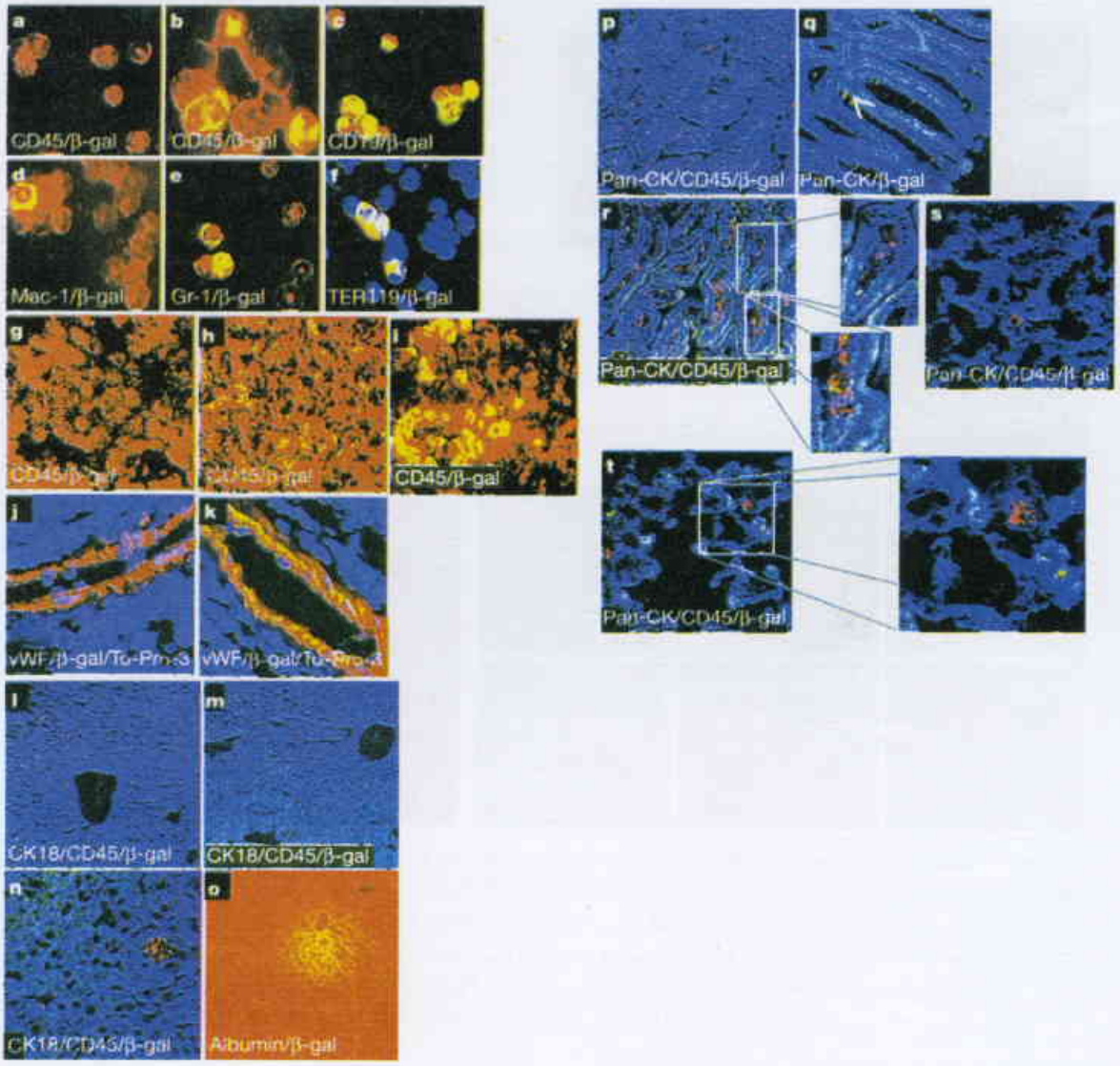


الشكل 5– تلون مناعي مفلور لأعضاء مفردة لفأر شيميري بنسبة 45%. **a-b** مقاطع دماغية للقشرة **(a)** والحصين **(b)** لونت باستعمال صد β-gal - Cy3، وصد GFAP-Cy5 وضد NeuN-FITC. **c-e** نقي عظم (بعد التثفيل) ملون بضد β-gal-FITC وضد CD45 مربوط مع PE **(c)**، وضد Gr-1 **(d)** أو ضد Mac-1 **(e)**. **f-h** طحال ملون بـ ضد β-gal-FITC وضد CD45 مربوط مع PE- **(f)** ضد CD3 **(g)**، ضد CD19- **(h)** و TO-PRO-3. **i**، كبد ملون مع ضد β-gal-FITC، وضد CD45-PE وضد CK18-Cy-5. **j**، الأمعاء الدقيقة ملونة بضد β-gal-FITC، وضد CD45-PE و Pan-CK-Cy-5. **k**، رئة ملونة بضد β-gal-FITC، ضد CD45-PE و Pan-CK-Cy-5. **l**، عضلة هيكلية ملونة بضد β-gal-FITC، وضد الديستروفين Cy3 و TO-PRO-3. **m**– قلب ملون بضد β-gal-FITC، ضد التروبين القلبي -Cy3-1 و TO-PRO-3. تعرض المقاطع المؤطرة بتكبير أكثر في الجوار (اللوح اليميني). الألوان الظاهرة: Cy3: أحمر، FITC: أزرق، Cy5: أزرق، TO-PRO-3: أزرق. التكبير : a-40 مرة، b -20 مرة،c-e100 مرة، f-60h مرة، i-m 20 مرة، كل الصور 60 مرة.

وفي المعي، تحتوي خبايا زغابات القناة الهضمية جماعة من 4–5 خلايا جذعية مديدة العمر [5]، ويطرأ عليها عدة دورات خلوية انقسامية في الجزء العلوي والمتوسط من الخبية، وتغطي خلايا ظهارية تهاجر بالاتجاه العلوي خارج الخبية على طول الزغابات المجاورة. وقد غطت خلايا ناشئة من خلايا ظهارية للمعطي من نمط $CD45^-$ و$Pan\text{-}cK^+$ و$\beta\text{-}gal^+$ بالكامل عدة زغابات. وشكّلت خلايا، في بعض الزغابات، من النمط $\beta\text{-}gal^+$ و$Pan\text{-}cK^+$ و$CD45^-$ 50% فقط من محيطها (الشكل 6r، الجزء العلوي المكبر). تدلّ على الانزراع في خبية واحدة وليس في خبيتين. وشوهدت خلايا متعددة نمط $\beta\text{-}gal^+$ و$Pan\text{-}CK^-$ بوضوح في لب الزغابات المعوية (السهم المفتوح في الشكل 6q). وتتشارك هذه الخلايا بالتلون من أجل CD45 (الشكل 6r) مما يشير إلى أنها خلايا مولدة الدم ناشئة من المعطي. وفي الرئتين كانت حوالي 4% من الخلايا الظهارية السنخية، موجبة الـ $Pan\text{-}CK^+$ وسالبة الـ $CD45^-$ من النمط $\beta\text{-}gal^+$. ويمكن أن نرى في المقطع نفسه أيضاً عدداً من خلايا مولدة الدم للمستقبل من النمط $Pan\text{-}CK^-$ و$CD45^+$ و$\beta\text{-}gal^-$ (الشكل 5t).

لم نلاحظ أية مساهمة للعضلات الهيكلية أو القلبية، وهي النسج التي، وعلى عكس الخلايا الظهارية، يلاحظ فيها تجدد خلوي قليل أو معدوم في غياب أذى نسيجي. ولذلك لايمكن لأحد أن يتوقع مساهمة واضحة للخلايا الجذعية في هذه الأنسجة. وبالرغم من أن خلايا mMAPCs الفأرية تتمايز إلى جلد وإلى ظهارة أنبوبية في الكلية عندما تحقن ضمن الكيسة الأرومية، فإننا لم نجد انزراعاً لها في الجلد أو الكلية والتي يحدث للخلايا الظهارية فيها تجديد سريع. ومع أن مقدرة خلايا MAPCs على التمايز إلى خلايا مماثلة للأدمة الظهارية العصبية خارج الحي، فإنه لم يلاحظ انزراع لخلايا mMAPCs الفأرية في الدماغ، ولم تتلون تشاركياً خلايا المعطي النادرة المصادفة في الدماغ بواسمات الأدمة الظهارية العصبية. وأظهرت دراستان حديثتان أن خلايا ناشئة من معطٍ بمواصفات الأدمة الظهارية العصبية كانت موجودة في دماغ الحيوانات التي خضعت لعملية زرع نقي العظم.على كل حال، اتبع هنا نظام استئصالي كامل تحضيري قبل الازدراع أو الازدراع في حيوانات حديثة الولادة [19، 22] وهي شروط مرافقة لكسر الحاجز الدموي الدماغي.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



الشكل 6– الانغراس وتمايز الـ mMAPCs في الحي. مقاطع نسيجية لفأر NOD/SCID (الجدول2: الحيوان رقم 12) بعد 11 أسبوعاً من انغراس 10^6 خلية جذعية MAPCs من سلالة ROSA26. **a-f**، نقي عظم شاهد (بعد التثفيل) **(a)** ودراسة حيوانات **b-f** ملونة بضد β-gal-FITC وأضداد لـ CD45 مرتبطة مع PE **(a,b)**، CD19 **(c)**، Mac-1 **(d)**، Gr-1 **(e)** وTER119و DAPI **(f)**. **g-i**، طحال شاهد **(g)** ودراسة حيوانات **(h-i)** ملونة بضد β-gal-FITC وأضداد CD45-PE. **j-k**، وعاء دموي في فأر شاهد. **(j)** ولمفوما صعترية في حيوان دراسة بعد 16 أسبوع من الازدراع **(k)** ملون بضد β- gal-FITC، وضد الـ vWF-PE وTO-PRO-3. **l-o** كبد شاهد **(l)** وحيوانات الدراسة **(m-o)** ملونة بضد β-gal-FITC. **l-n** تمت مشاركتها بتلوينين ضد CK18-Cy5 بالإضافة إلى CD45-PE و **(o)** بضد الألبومين Cy3. **p-r**، أمعاء لفأر شاهد **(p)** وحيوان دراسة **(q-r)** ملون بضد β-gal- FITC بالإضافة لضد Pan-CK-Cy5. يشير السهم في **q** إلى أكثر خلايا مولدة للدم. **p** و **r** تمت مشاركتها بتلوينين بضد الـ CD45-PE. **s-t** شاهد لرئة **(s)** وحيوان دراسة **(t)** ملون بضد β-gal-FITC بالإضافة لضد Pan-CK-Cy5 بالإضافة أيضاً لضد CD45-PE. الألوان الظاهرة : Cy3: أحمر، Cy5: أزرق، FITC: أخضر، TO-PRO-3: أزرق، DAPI: أزرق. تكبير **a-f**، 100 مرة **g**، **i-k**، **n** 60 مرة، **l,m,p-t** 20 مرة، **h,o** 10 مرات، وكل الصور 60 مرة.

وسرّبنا خلايا في حيوانات بالغة غير مشعّعة أو في حيوانات معالجة بجرعة إشعاعية منخفضة حيث بقي فيها الحاجز الدموي الدماغي سليماً أو متأذياً بحدود دنيا. وهذا يمكن أن يشرح غياب ازدراع خلايا mMAPCs في الجهاز العصبي المركزي.

وطور حيوان واحد لمفوما في الغدة الصعترية، والطحال بعد 16 أسبوعاً، ويعدُّ هذا شائعاً لدى فئران الـ NOD/SCID المعمرة [43]. وعلى الرغم من أن لمفوما الخلايا -B كانت ناشئة من المضيف (خلايا نمط $CD19^+$ كانت $\beta\text{-gal}^-$ سلبية)، وقد تلونت حوالي 40% من خلايا نمط $CD45^-$ السلبي و vWF^+ الإيجابي في الأوعية الدموية للورم بأجسام ضدية ضد β-gal، مما يشير إلى أن خلايا mMAPCs يمكن أن تساهم وظيفياً بتنشؤ ورمي دموي جديد في الحي (الشكل 6K). ويأتي دليل آخر من مستويات الازدراع والتمايز العالية الملاحظة في الأعضاء الحساسة إشعاعياً كنظام توليد الدم، وظهارة الأمعاء (الجدول 2، $p < 0.001$) بعد التشعيع بجرعة إشعاعية منخفضة، ويشير هذا إلى أن mMAPCs يمكن

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

أن تسهم وظيفياً في نسج المضيف. وسيكون هناك حاجة لدراسات مستقبلية لتبيان حدوث إعادة تجمهر خلوي وظيفي تحصل لأعضاء أخرى في منشآت الازدراع ما بعد الولادي.

واختبرنا فيما إذا كان نقي عظم من متلقي خلايا MAPC أولي يحتوي على خلايا تزرع في مستقبلين ثانويين. واكتشف أن 1.5×10^7 خلية نقي عظم مأخوذة من مستقبلين أوليين (الجدول 2، الحيوان 11 و12) بعد 11 أسبوعاً من انتشار خلايا mMAPCs الفأرية انتشرت في مستقبلين ثانويين مشعَّعين NOD/SCID (الجدول 2، الحيوان SR-1 وSR-2). وضحي بالمستقبلين الثانويين بعد 7 و10 أسابيع، ودرست نسجهم لملاحظة الانزراع. ولوحظ نمط انزراع مشابه في مستقبلين ثانويين كما هو الحال في المستقبلين الأوليين. وكانت حوالي 4% إلى 8% من خلايا نقي العظم والطحال والدم المحيطي من نمط β-gal$^+$، و CD45$^+$، و6%، 8% من خلايا ظهارة الأمعاء، وكانت 4%، 5% من خلايا ظهارة الرئتين من نمط β-gal$^+$ و Pan-CK$^+$ و CD45$^-$. ومع ذلك كانت مستويات الازدراع في كبد المستقبلين الثانويين أخفض منها في المستقبلين الأوليين. (1% و3% مقارنة بـ 5% و8% لـ β-gal$^+$ و CK18$^+$). و يشير ذلك إلى أن خلايا mMAPCs الفأرية يمكن أن تبقى في نقي عظم المستقبل الأولي وتتمايز إلى خلايا مولدة للدم، بالإضافة إلى خلايا ظهارية عندما تنقل إلى مستقبل ثانٍ.

وكشاهد، نشرنا خلايا MAPCs في ROSA26 نُمِّيت حتى امتلاء وعاء سطح الزرع قبل الحقن. وفقدت خلايا MAPCs، التي تركت لتصبح ممتلئة على السطح، قدرتها على التمايز خارج الحي في خلايا خارج الأدمة الوسطى، وتصرفت كخلايا جذعية متوسطية تقليدية من الأدمة الوسطى [28]. ولم يؤد نشر 10^6 من خلايا mMAPCs الفأرية المكتظة إلى مستويات ازدراع ذات دلالة لخلايا المعطي. وعلى الرغم من ملاحظة بعض خلايا إيجابية β-gal$^+$ في نقي العظم، فإنها لم تتشارك بالوسم بأضداد ضد CD45، أو يشير هذا إلى أن خلايا جذعية متوسطية يمكن أن تنزرع في نسج لكنها غير قادرة بعدها على التمايز إلى خلايا نوعية النسيج استجابة لمشعرات موضعية.

وعكس الخلايا الجذعية الجنينية ES، لم نكشف أي ورم منشأ المعطي في أي حيوان من الحيوانات. وعلى الرغم من أن الخلايا الجذعية الجنينية ES تسهم في إعطاء كافة النسج إذا حقنت في الكيسة الأرومية، فإن ازدراع خلايا جذعية جنينية ES غير متمايزة يؤدي إلى تشكل أورام عجائبية teratomas لم تلاحظ في نموذجنا. ولم يؤد النشر الوريدي للخلايا الجذعية الجنينية ES، علاوة على ذلك، إلى ازدراع وتمايز نوعي النسيج في الحي، إلا إذا حرضت الخلايا الجذعية الجنينية ES لتتحدد بالنسيلة قبل الازدراع.

المناقشة

هناك ثلاثة اكتشافات في دراستنا توجه عدة أسئلة مهمة وحاسمة في مجال تصنيعية الخلايا الجذعية [44]، يتناول السؤال الأول تحويل خلايا جذعية ناشئة من نقي العظم إلى خلايا بطانة داخلية ظهارية، وأدمة خارجية وداخلية في الزجاج وفي الحي، ويتم ذلك على مستوى خلية واحدة. والسؤال الثاني، تشير دراسات الكيسة الأرومية إلى أن خلايا MAPSs تسهم وظيفياً بإنشاء أغلب النسج الجسمية. والسؤال الثالث هو حدوث ازدراع مبكر ودائم وصلب في الحي عندما ازدرعت خلايا MAPCs في مستقبلين غير متأذين (سليمين).

وقد وجدنا أن خلايا MAPCs تحتاج إلى توفر شروط استنبات خلوية خاصة بالخلايا الجذعية الجنينية ES، وتعبر على الأقل عن بعض الواسمات الوراثية الخاصة بالخلايا الجذعية الجنينية ES (Oct-4, Rex-1, SSEA-1)، وتملك مقدرة تكاثرية وتمايزية إلى العديد من السلالات كامنة وواسعة، وتسهم في إعطاء كافة الأعضاء فيما لو حقنت داخل الكيسة الأرومية، لكنها تنزرع وتتمايز إلى خلايا نوعية النسيج استجابة إلى مؤثرات نوعية العضو. وقد اقترح مؤخراً حدوث اندماج خلوي كتفسير لامتلاك الخلايا الجذعية لصفة التصنيعية.

وأمكن في دراستين تحريض اندماج خلايا جسمية مع خلايا جذعية جنينية ES في الزجاج، وأدى ذلك إلى توليد خلايا رباعية الصيغة الصبغية tetra ploid بمواصفات شبيهة بمواصفات الخلايا الجذعية الجنينية ES [45، 46]، وأظهرت دراستنا في الزجاج أن خلايا MAPCs ذات صيغة صبغية حقيقية مفردة euploid لا تقبل الاستنبات المتشارك مع خلايا من نسيج محدد أو مع خلايا جذعية جنينية ES تتمايز إلى خلايا الطبقات الجنينية المنشئة الثلاث، وهذا يشير إلى أن سلوك خلايا MAPCs في الزجاج لايمكن أن يعود لاندماج الخلايا الجذعية.

وعلى الرغم من أنه لم تجر أعمال قطعية في الحي لنفي إمكانية كون الاندماج الخلوي هو المسؤول عن التمايز إلى نسج عديدة، فإن التواتر المرتفع الملاحظ لتشكل الشيميرية والشيميرية المتوازنة يختلف عما هو ملاحظ في [46].

في النهاية، إن سرعة وصلابة الاستزراع والتمايز إلى نسج نوعية الملاحظين في الحيوانات بدون حاجة إلى ضغط انتخابي تأتيان أيضاً كدليل ضد الفكرة السائدة أن الازدراع والتمايز في حيوانات بعد الولادة ناتج عن الاندماج الخلوي.

وهناك احتمال ثانٍ ببقاء الخلايا الجذعية متعددة القدرات في العديد من الأنسجة حتى بعد الولادة، وأنه عندما تحرَّض فإنها تتكاثر وتتمايز كاستجابة لمؤثرات موضعية من العضو الموجودة فيه. واحتمال ثالث يتمثل بإمكانية إعادة برمجة وراثية لخلية جذعية نوعية نسيج ما في المستنبت مماثلة لما يجري في عملية التنسيل [47، 48].

ولم تظهر الدراسات الوراثية الخلوية الشهرية لسلالة mMAPCs الفأرية وrMAPCs الجرذية أي تبدلات صبغية [28] إلا في جماعة خلوية من mMAPCs التي أصبحت متعددة الصيغة الصبغية بعد تضاعفها 45 مرة، ولم تستعمل بعدها في الدراسات.

وعندما نُمِّيت خلايا mMAPCs أو rMAPCs حتى درجة التشابك، فإنها توقفت عن التكاثر، وعندما استنبتت في وسط خالٍ من السيروم والسيتوكينات محرضة التمايز وبعد 40 أو أكثر من 120 دورة تضاعف توقف النمو ولوحظ تمايز نهائي.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

كذلك لم يلاحظ تشكل أورام في فئران مصابة بعوز مناعي تلقت خلايا mMAPCs عبر الوريد. وهكذا، ولو حصلت إعادة برمجة في الزجاج تحت شروط استنبات الـ MAPCs، فإنه ليس لدينا دليل على حدوث التحول.

وتقدِّم الخلايا الجذعية، وبغض النظر عن مصدرها، وعوداً وأملاً كبيراً لمعالجة الأمراض الوراثية والتنكسية. ويمكن استعمال خلايا MAPCs متخالفة وراثياً، وبصورة مشابهة لاستعمال الخلايا الجذعية الجنينية ES، لتصحيح الأمراض التنكسية أو الولادية. وتتمايز خلايا MAPCs إلى خلايا مولدة للدم في الحي، ويمكن هكذا استعمالها لتشكيل شيميري مولد للدم، الأمر الذي يجعل المعالجة الخلوية المتخالفة وراثياً أمراً قابلاً للإنجاز. وعكس الخلايا الجذعية الجنينية ES، يمكن انتخاب خلايا MAPCs من نقي عظم الشخص نفسه، واستخدامها بحالة غير متمايزة أو بعد معالجة وراثية في المعالجات الموضعية أو الجهازية. وعلاوة على ذلك، يسمح غياب تشكل الأورام العجائبية عند نشر خلايا MAPCs غير المتمايزة باستعمال MAPCs لمعالجة أمراض جهازية كالأعواز الأنزيمية الوراثية أو الخثل العضلي.

طرائق العمل

الأضداد المستعملة

الأضداد المضادة NF-200 (نسيلة N52 ؛1:400)، GalC (1:100; G-9152)، CK18 (1:300; C-8541)، Pan-CK (1:100; C-2562)، ألبومين (1:100; A-6684)، GABA- (1:500; A-2052)، MAP2 (1:400; AP20)، دوبا ديكاربوكسيلاز (1:100; DDC-109)، تيروزين هيدروكسيلاز (1:1000; TH-16)، سيروتونين (1:1000; S-5545)، تروبونين قلبي-I (1:100; sc-8118)، والديستروفين (1:100; D-8168) كانت جميعها من شركة سيغما (Sigma). وكانت الأضداد متعددة النسيلة المضادة لـ Tau, vWF, FLK-1 وللعامل النووي الكبدي HNF)-1) من شركة Santa Cruz Biotechnology. وكان الضد المضاد لـ: GFAP من شركة Santa Cruz Biotechnology أو من شركة DAKO. والضد المضاد لـ CD31 كان من شركة BD-PharMingen. وكان شاهد الإيمينوغلوبيلين γ و FITC، والأضداد الثانوية الموسومة بـ Cy3 من شركة سيغما Sigma. وكانت الأضداد الموسومة بـ Cy5 من شركة Chemicon العالمية. وكانت المواد التالية: ضد حماري NeuN (1:100)، والضد GFAP (1:500)، وضد β-gal (1:2000) من شركات Chemicon، Sigma، Cortex Biochem على التتالي. وكانت الأضداد الثانوية ضد الحمارية (Cy-5, 1:200; Cy-3, 1:400; FITC, 1:200) من شركة Jackson Immunoresearch. وكان الضد المضاد لـ β-gal-FITC من شركة Rockland Immunochemicals. وكانت المواد التالية: الأضداد المرتبطة بـ FITC أو Phycoerythrin (PE) المضادة لـ CD45، Gr-1، Mac-1، CD19، CD3، CD13، c-Kit، Sca-1، CD34، Thy-1، FLK-1، MHC الصف I ($H-2k^k$)، MHC الصف II($I-A^k$)، CD44 من شركة BD-Pharmingen، والضد المضاد لـ SSEA-1 كان من بنك تطوير دراسات الـ Hybridoma (النغول).

مُستنبَت التمايز والتحليل

أعيد نشر نسيلة $eGFP^+$ أو ROSA26 mMAPCs في 60% DMEM-LG، 40% MCDB-201، ITS، LA-BSA؛ 10^{-9}M ديكساميتازون، 10^{-4} M حمض الاسكوربيك فوسفات -2، U100 بنسلين و U1,000 ستربتومايسين [28، 29]. حُرِّض تمايز البطانة الداخلية بـ VEGF كما هو موصوف في المرجعين [28، 29]. ونشرت للتمايز باتجاه الأدمة الظهارية العصبية خلايا mMAPCs بمعدل 1×10^4 خلية بالسم2 في أوعية استنبات على FN مع 100 نانوغرام/مل من الـ bFGF (R&D System) عولجت الخلايا، كحل بديل، على التتابع مع 100 نانوغرام/مل من الـ bFGF لمدة 7 أيام، 10 نانوغرام/مل من FGF-8 لمدة 7 أيام و10 نانوغرام/مل BDNF لمدة 7 أيام من (R&D Systems). حُرِّض تمايز الخلايا الكبدية كما هو مشار إليه في [30]. ثبتت الخلايا بـ 4% بارافورمالدهيد والميتانول في حرارة الغرفة، وحُضنت بعدها 30 دقيقة على التتالي مع أضداد أولية ثم مع أضداد ثانوية. وغسلت المحضرات بين المراحل باستعمال PBS/ BSA. وفحصت الخلايا باستعمال مجهر مفلور متحد البؤرة (مجهر 1024 متحد البؤرة Olympus AX70، شركة Olympus للبصريات)، ولتقدير تواتر مُختلَف أنماط الخلايا في مستنبت حسبنا عدد الخلايا الملونة إيجابياً لضد معين في أربعة حقول طاقة منخفضة بصرية (200−500 خلية بالحقل).

اختيار النسيج والتحاليل

حُضِّرت مقاطع، من أجل محضرات الفأر كاملاً، لكامل الجسم بثخانة 10 مكرومتر قرب المنطقة الوسطى كما هو موصوف في [41]. ولونت المقاطع النسيجية من أجل رؤية فعالية أنزيم β - غالاكتوسيداز باستعمال طاقم التلوين β- gal من شركة Invitrogen وبدرجة حموضة (PH = 7.4). واتبعت تعليمات المصنع باستثناء التثبيت حيث حضنت المقاطع النسيجية لمدة 5 دقائق بدلاً من 10 دقائق.

وحصلنا على كمية دم كلية مساوية لـ 0.5 -1 مل من كل حيوان عندما ضُحِّي به. وجمع نقي العظم باستعمال السحب السريع من عظم الفخذ والساق. وقُصدت الكريات الحمراء ونقي العظم للتنميط المناعي باستعمال الأمونيوم كلوريد الثلجي والمبرد (من شركة تقانات الخلايا الجذعية)، واستعملت 10^5 خلية من أجل التفيل الخلوي. ولتجارب الازدراع المتسلسل ازدرعت 1.5×10^7 خلية من نقي عظم فخذين وساقين في أفراد متقبلين ثانويين بالحقن في الوريد الذيلي. وثبتت عينات الخلايا المثفلة من الدم ونقي العظم باستعمال الأسيتون لمدة 10 دقائق بحرارة الغرفة.

ونُفخت الرئتان باستعمال 1 مل من مركب Optimum cutting temperature (OCT) في الـ PBS بنسبة (1: 4) (شركة Sakura-Finetek). وجمعت عينات الطحال، والكبد، والرئتين، والأمعاء، والعضلات الهيكلية، وعضلة القلب، والكلية والدماغ من الحيوانات المتقبلة، وحفظت في محلول OCT بدرجة حرارة 80°C- وفي RNA لاحقاً من شركة (Ambion) بدرجة حرارة 20°C- ومن أجل PCR

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الكمي، وضعت مقاطع ثخنها 5 مكرومتر مجمدة على صفائح مجهرية زجاجية وثبتت في الأسيتون لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة. ولونت المحضرات بعد الحضن في سيروم وحيد النمط لمدة 20 دقيقة على التتابع باستعمال أضداد مستضدات النمط الخلوي، ضد مضاد β-gal، وفي بعض الحالات أضداد مضادة لـ CD45 أو ملون معاكس نووي (4, 6-diamino-2-phenylinole (DAPI) أو TO-PRO-3).

REFERENCES المراجع

[1] Thomson, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-1147 (1998).

[2] Frankel, M. S. In search of stem cell policy. Science 298, 1397 (2000).

[3] Weissman, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Sciences287, 1442-1446 (2000).

[4] Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433-1438 (2000).

[5] Potten, C. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 353, 821-830 (1998).

[6] Watt, F. Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 353, 831 (1997).

[7] Alison, M. & Sarraf, C. Hepatic stem cells. J Hepatol. 29, 678-683 (1998).

[8] Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147 (1999).

[9] Ferrari, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279, 528-530 (1998).

[10] Gussoni, E. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature 401, 390-394 (1999)

[11] Orlic, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410, 701-705 (2001).

[12] Jackson, K. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J. Clin. Invest. 107, 1395-1402 (2001).

[13] Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A. & Hebbel, R. P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J. Clin. Invest. 105, 71-77 (2000).

[14] Asahara, T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ. Res. 85, 221-228 (1999).

[15] Petersen, B. E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284, 1168-1170 (1999).

[16] Theise, N. D. et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology 31, 235-240 (2000).

[17] Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nature Med. 6, 1229-1234 (2000).

[18] Krause, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 105, 369-377 (2001).

[19] Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I. & Blau, H. E. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 290, 1775-1779 (2000).

[20] Kopen, G., Prockop, D. & Phinney, D. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 10711-10716 (1999).

[21] Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 290, 1779-1782 (2000).

[22] Sanchez-Ramos, J. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp. Neurol. 164, 247-256 (2000).

[23] Bjornson, C., Rietze, R., Reynolds, B., Magli, M. & Vescovi, A. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science 283, 354-357 (1999).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[24] Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N. & van der Kooy, D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. Nature Med. 8, 268-273 (2002).

[25] Jackson, K., Mi, T. & Goodell, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 14482-14486 (1999).

[26] Kawada, H. & Ogawa, M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. Blood 98, 2008-2013 (2001).

[27] Clarke, D. L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 288, 1660-1663 (2000).

[28] Reyes, M. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood 98, 2615-2625 (2001).

[29] Reyes, M. et al. Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow. J. Clin. Invest. 109, 337-346 (2002).

[30] Schwartz, R. E. et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J. Clin. Invest. 109, 1291-1302 (2002).

[31] Odorico, J. S., Kaufman, D. S. & Thomson, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 19, 193-204 (2001).

[32] Williams, R. L. et al. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 336, 684-687 (1988).

[33] Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. & Gruss, P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. EMBO J. 8, 2543-2550 (1989).

[34] Ben-Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J. & Bergman, Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. Mol. Cell Biol. 18, 1866-1878 (1998).

[35] Jordan, C., McKearn, J. & Lemischka, I. Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. Cell 61, 953-963 (1990).

[36] Nolta, J., Dao, M., Wells, S., Smogorzewska, E. & Kohn, D. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. Proc. Natl Acad. Sci USA 93, 2414-2419 (1996).

[37] Lenvik, T., Lund, T. C. & Verfaillie, C. M. Blockerette-ligated capture T7 amplified RT-PCR, a new method for determining flanking sequences. Mol. Therapy (in the press).

[38] Palmer, T. D. Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F. & Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. J. Neurosci, 19, 8487-8497 (1999).

[39] Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. & McKay, R. D. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nature Biotechnol. 18, 675-679 (2000).

[40] Zambrowicz, B. P. et al. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. Proc. Natl Acad. Sci USA 94, 3789-3794 (1997).

[41] Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M. K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. Nature 401, 101-105 (2001).

[42] Weiss, M. J. & Orkin, S. H. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. Exp. Hematol. 23, 99-107 (1995).

[43] Prochazka, M., Gaskins, H. R., Shu'tz, L. D. & Leiter, E. H. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. Proc. Natl Acad. Sci USA 89, 3290-3294 (1992).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[44] Anderson, D. J., Gage, F. H. & Weissman, I. L. Can stem cells cross lineage boundaries? Nature Med. 7, 393-395 (2001).

[45] Terada, N. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature 416, 542-545 (2002); advance online publication, 13 March 2002 (doi: 10.1038/ nature 00730).

[46] Ying, Q. Y., Nichols, J., Evans. E. P. & Smith, A. G. Changing potency by spontaneous fusion. Nature 416, 545-548 (2002); advance online publication, 13 March 2002 (doi: 10.1038/ nature 729).

[47] Rideout, W. M. et al. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. Nature Genet. 24, 109-110 (2000).

[48] Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir. J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810-813 (1997).

[49] Pear, W. S. et al. Efficient and rapid induction of a chronic mylogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. Blood 92, 3780-3792 (1998).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

خلايا نقي العظم تتبنى النمطَ الظاهري لخلايا أخرى باندماج خلوي تلقائي*

ن. تيرادا، ت. هما زاكي، م. أوكا، م. هوكي، د. م. ماستاليرز، ل. موريل، ب. ي. بيترسن
قسم علم الأمراض
ن. تيرادا، ب. ي. بيترسن، إ. و. سكوت
برنامج بيولوجيا الخلية الجذعية - مركز شاندس للسرطان
ي. ناكانو، أ. م. مير
قسم علم الأدوية
إ. و. سكوت
قسم علم الوراثة الجزيئية والأحياء الدقيقة - جامعة فلوريدا - كلية الطب - غينزفيل - فلوريدا - الولايات المتحدة الأمريكية.

ملخص

أوضحت الدراسات الحديثة بأنه يمكن لخلايا نقي العظم المزدرعة أن تتحول إلى ذريات غير متوقعة تشتمل على خلايا عضلية، وخلايا كبدية، وخلايا عصبية وعلى العديد غيرها [1]. وتكمن معضلة هذه الإمكانية في مناقشات مثل هذا التمايز الانتقالي transdifferentiation في الوسط الحي in vivo، والتي تميل إلى الاعتقاد بأن ثمة أصلاً مانحاً لخلايا التمايز الانتقالي يقوم على أساس وجود جينات نوعية مانحة مثل واسمات الصبغي Y[1]. ونوضح هنا أنه يمكن لخلايا نقي عظم الفأر أن تندمج بشكل تلقائي مع خلايا جذعية جينية في مستنبت في الزجاج in vitro الذي يشتمل على الإنترلوكين -3. وعلاوة على ذلك، فإنه يمكن لخلايا نقي العظم المندمجة تلقائياً أن تتبنى فيما بعد النمط الظاهري للخلايا المستقبلة، والتي يمكن أن تسمَّى بدون تحليل وراثي تفصيلي بظاهرة (عودة التمايز) أو (التمايز الانتقالي).

الكلمات المفتاحية: التمايز الانتقالي، الازدراع، الخلية الجذعية، الخلية الجنينية، نقي العظم، النمط الوراثي، النمط الظاهري، الاندماج الخلوي.

تشير الدراسات المتقدمة الخاصة ببحث الخلية الجذعية إلى أن بعض خلايا ثدييات محددة، حتى ولو كانت مأخوذة من البالغين، تحافظ على درجة عالية من المرونة مؤدية إلى تمايز خلوي متعدد الذريات، ويمكن للنوى المنقولة من خلايا بالغة أن تُعاد برمجتها بواسطة عامل، أو عوامل متوفرة في سيتوبلازما الخلية البُيَيضية مظهرة الإمكانية نفسها لنمو حيواني طبيعي مثل إمكانية النوى الجنينية المبكرة [2]. كما تبيّن حالياً إمكانية تمايز الخلايا الجذعية العصبية عملياً إلى أي نمط خلوي آخر حينما تحقن في الكيسات الأرومية blastocysts في الوسط الحي أو حينما تستنبت في الزجاج مع خلايا جذعية جنينية متمايزة [3]. يشير هذا الأمر إلى أن العامل أو العوامل الخلوية الخارجية في الخلايا الأرومية، أو في الخلايا الجذعية الجنينية، أو التآثر الخلوي - الخلوي في الخلايا الجذعية العصبية مع مثل هذه الخلايا الجنينية، قد يكون كافياً لإعادة برمجة الخلايا البالغة إلى حالة أعلى من متعددة الفعّالية. ووصولاً إلى هذه النتيجة، فقد حاولنا تجهيز مستنبت من خلايا جذعية متعددة الفعالية في الزجاج انطلاقاً من خلايا بالغة (خلايا نقي العظم) وذلك بحضنها مع خلايا جذعية جنينية. يحتوي نقي العظم على خلايا جذعية تنتج جميع الخلايا الدموية، وخلايا جذعية لنسيج متوسط [4]. وإضافة إلى ذلك، فإن ازدراع خلايا نقي العظم البالغ يولد أنماطاً ظاهرية غير متوقعة في الوسط الحي تشمل خلايا عضلية [5]، وخلايا الكبد [6-8]، وخلايا الدماغ [9, 10] وسواها [11]. تشير هذه النتائج إلى أن نقي العظم البالغ قد يشتمل على خلايا جذعية متعددة الفعّالية، أو على خلايا جذعية يمكنها أن تصبح متعددة الفعّالية تحت شروط مناسبة.

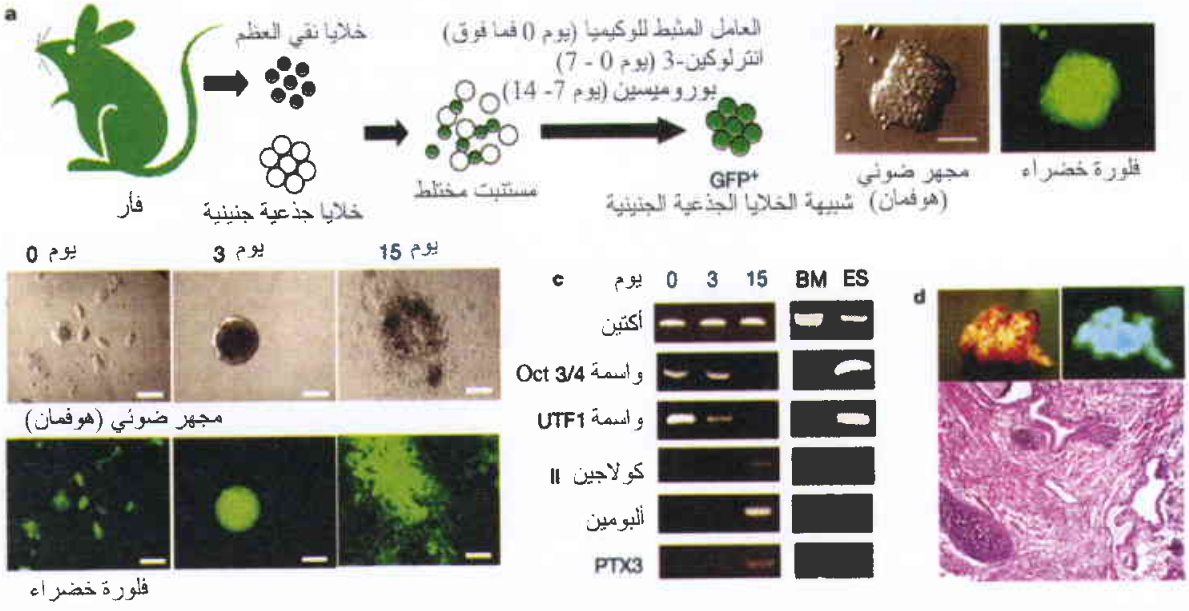
تمَّ استحصال خلايا نقي عظم، من عظم فخذ أنثى فأر بعمر 8-9 أسابيع محوَّرة وراثياً معطية بروتيناً مفلوراً أخضر اللون GFP وجينة مقاومة للبوروميسين puromycin [12]. تمَّ مزج (1×10^6) خلايا وحيدات النوى من نقي عظم مع ($R1,1 \times 10^4$) خلية جذعية لجنين فأر مذكر في وسط استنباتي لخلايا جذعية جنينية يحوي عاملاً مثبطاً لابيضاض الدم leukaemia (LIF) [13]، ووضعت في وعاء استنباتي مغلف بالجيلاتين لتحريض نمو خلايا مولِّدة للدم haematopoietic، تمَّت إضافة مادة الإنترلوكين 3-(IL) إلى المستنبت خلال الأيام السبعة الأولى. جُمعت الخلايا العائمة بانتظام وعلى التعاقب في اليومين الثالث والسابع للاستنبات، ونُقلت كل مجموعة إلى وعاء جديد مغلف بالجيلاتين كل

* نُشر هذا المقال في مجلة *Nature*, Vol.416, 4 April 2002. ترجمة الدكتور عبد الرحمن مراد - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

وقت ويشتمل على الوسط نفسه المذكور أعلاه، وأُضيف البوروميسين إلى الوسط الاستنباتي بعد 7 أيام من هذه العملية بهدف إزالة الخلايا الجذعية الجنينية، وبعد 3 أسابيع وجدنا نسائل clones إيجابية متعددة من بروتين مفلور أخضر اللون GFP مشابهة شكلياً للخلايا الجذعية الجنينية (تنمو على شكل مستعمرة مسطّحة مؤلفة من خلايا مقترنة مع بعضها بشدة) (الشكل 1a). تتكاثر هذه النسائل بسرعة مكافئة لسرعة تكاثر الخلايا الجذعية الجنينية الشاهدة لمدة تزيد عن 6 أشهر. إن التعبير عن البروتين المفلور الأخضر اللون GFP والمقاومة للبوروميسين يشيران إلى أن الخلايا شبه الجذعية الجنينية التي يعبر عنها البروتين المفلور الأخضر اللون قد تمّ اشتقاقها من خلايا نقي العظم.

عندئذ أُخضعت الخلايا المأخوذة من نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية (BMESL) إلى برنامج تمايزي في الزجاج لخلايا جذعية جنينية (الشكل 1b) [15, 14]. ولدى إزاحة العامل المثبّط لابيضاض الدم (LIF)، شكّلت هذه الخلايا كرة من خلايا متجمعة في مستنبت عائم (الشكل 1b اليوم الثالث) وتمايزت إلى أشكال متنوعة تشتمل على خلايا عضلية قلبية نابضة بعد التصاق الخلايا المتجمعة بوعاء المستنبت الخلوي (الشكل 1b اليوم الخامس عشر). تمّ فحص التعبير الجيني بتقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز بواسطة عملية النسخ العكسي (RT-PCR)، (الشكل 1c). إن التعبير كان عالياً لـUTF1 و Oct 3/4 واسمات الخلايا الجذعية الجنينية غير المتمايزة BMESL [17, 16]، إلا أن هذا التعبير يتناقص حينما يتم تمايز هذه الخلايا الأخيرة، وبالمقابل فإن تعبير المورثات التي تشير إلى تمايز كل من الأديم المتوسط mesoderm: (brachyury and collagen II) والأديم الباطن endoderm: (α-feto-protein and albumin) والأديم الظاهر ectoderm:(neurofilament H, dopamine β hydroxylase and PTX3) قد حرّض على إزاحة العامل المثبط لابيضاض الدم (LIF). وبالإضافة إلى ذلك، فإنه حين تمّ استنبات خلايا نقي العظم المذكورة أعلاه على وسط خلايا PA6 [18]، تمايزت هذه الخلايا تمايزاً سائداً إلى خلايا شبيهة شكلياً بالعصبونات ومعبرة عن أنزيم هدروكسيلاز التيروزين (المعطيات غير موجودة)، كما أنها كانت قابلة لتشكيل ورم مسخي أو مشوّه حينما حقنت في فئران NOD/SCID ممنعة توافقياً immunocompromised (الشكل 1d).



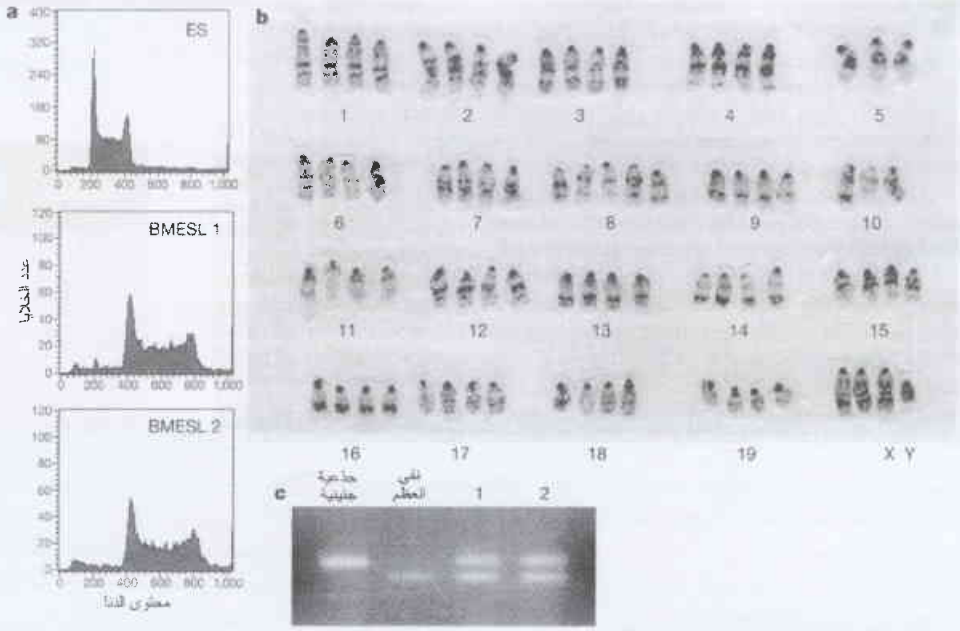
تفترض المعطيات تشكيل خلايا جذعية جنينية متعددة الفعالية شبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية من خلايا نقي عظم بالغة وذلك بحضنها مع خلايا جذعية جنينية. وعلى كل حال، فإن التحليل الوراثي لخلايا نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية (BMESL) يقود إلى نتيجة بديلة غير متوقعة. تمّ فحص الصيغة الصبغية ploidy للدنا DNA (عدد نسخ

الشكل 1- تمّ الحصول على خلايا شبه جذعية جنينية مجردة من البروتين المفلور الأخضر اللون GFP من مستنبت يحوي مزيجاً من خلايا نقي عظم تحتوي على البروتين المفلور الأخضر اللون GFP+ وخلايا جذعية جنينية مجردة من هذا البروتين GFP-. (a) تم استنبات خلايا نقي عظم فأرية (BM) من عظام أفخاذ إناث فئران محوّرة جينياً يعبّر عنها بروتين مفلور أخضر اللون GFP (انظر الطرائق) مع خلايا جذعية جنينية من ذكور فئران (ES) من السلسلة (R1) في وسط استنباتي جذعي جنيني يشتمل على 1.000 وحدة/مل من العامل المثبط لابيضاض الدم LIF المؤشب، بوجود الإنترلوكين -3 (1ng/مل من 0-7 أيام) والبوروميسين (5 مكروغرام/مل من 7-14 يوماً). وفقاً للأوقات المشار إليها وجدت في المستنبت النسائل المجردة من البروتين المفلور الأخضر اللون والشبيهة شكلياً بالخلايا الجذعية الجنينية خلال ثلاثة أسابيع من بداية الاستنبات. خطوط القياس 100μm. (b) تمايز خلايا نقي العظم شبه الجذعية الجنينية في الزجاج (نسيلة رقم1) خطوط القياس 200μm. (c) تمّ استخراج مجمل RNA من خلايا نقي العظم شبه الجذعية الجنينية المتمايزة (خلال 0-3-15 يوماً)، وخلايا نقي العظم والخلايا الجذعية الجنينية. تمّ تركيب DNA المتمم في 2 مكروغرام من مجمل RNA. تمّ اشتقاق مرشّسات الدنا، بالنسبة لكل مورثة، من إكسونات مختلفة للتأكيد بأن ناتج التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) يمثل أنماط الرنا الرسول النوعية وليس الدنا الجينومي. إن تتالي مرشّسات الدنا موضّحة في نشرة ملحقة. (d) تمّ حقن خلايا نقي العظم شبه الجذعية الجنينية BMESL بمعدل (1×10^5 خلية) في طحال فأر من سلالة NOD/SCID. وخلال أربعة أسابيع، تشكل ورم (بقطر 2.5 مم تقريباً) على الطحال (أعلى اليسار) الذي بدا بروتيناً مفلوراً أخضر اللون عقب تعرضه لأشعة فوق بنفسجية (أعلى اليمين). يشتمل الورم على أنماط خلوية متنوعة تتضمن chondrocytes وخلايا عضلية مخططة، وبُنى شبه غدية تمّ توضيحها بملوّن هيماتوكسيلين - أيوزين (مجهر عادي x 100).

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الدنا) بشكل أولي بواسطة تصنيف خلوي منشط الفلورة (تحليل FACS) fluorescence-activated cell sorting وذلك بعد تلوين الدنا DNA بواسطة يوديد البروبيديوم propidium iodide. أظهرت نسائل نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية (BMESL) الثلاث عشرة جميعها محتوى من الدنا DNA أعلى من صيغة صبغية مضاعفة، إذ وجد أن هذا المحتوى قد أصبح رباعي الصيغة الصبغية (4n) تقريباً لدى 11 نسيلة، بينما بدا سداسي الصيغة الصبغية (6n) تقريباً لدى النسيلتين المتبقيتين (الشكل 2a) وحينما فحص النمط النووي لدى خطين من رباعيات الصيغة الصبغية تبيَّن أن كلاً منها يشتمل على الصبغيات الجنسية XXXY وإن عدد أنموذج الصبغيات لديها يتراوح ما بين 78–79 صبغياً (الشكل 2b)، وإضافة إلى ذلك، فقد أبدت خلايا نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية نمطاً وراثياً هجيناً من الخلايا الجذعية الجنينية ومن خلايا نقي العظم وذلك بتضخيم التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR لتوابع دقيقة microsatellites متعددة، والتي اتَّسمت بالتعدد الشكلي مابين جينوم (الذخيرة الوراثية) خلية نقي العظم (غالباً C57BL/6) وجينوم الخلية الجذعية الجنينية (129/Sv)، (الشكل 2c). تشير هذه المعطيات إلى أن خلايا نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية BMESL كانت قد تولّدت نتيجة الاندماج الذي حصل مابين الخلايا الجذعية الجنينية وخلايا نقي العظم. إن حقن كيسة أرومية من خلايا BMESL قد فشل في تكوين فئران أسطورية (عجيبة) ذات نمط ظاهري مفلور بالأخضر، يتَّسم بالنمط الوراثي ذي الصيغة الصبغية الرباعية [19]، وتجدر الإشارة إلى أن سيطرة النمط الظاهري متعدد الفقاليات على الاندماج الخلوي للخلايا الجذعية الجنينية (أو خلايا الأصل الجنينية) والخلايا الجسمية قد تمَّ الحديث عنه سابقاً [20, 21].

ووفق ما أُشير إليه أعلاه، ومن خلال أربع تجارب مستقلة عن بعضها البعض، فقد تمَّت إعادة توليد خلايا أشبه بالخلايا الجذعية الجنينية مفرطة التضاعف الصبغي، حينما قمنا بمعاملة مزيج من خلايا نقي العظم والخلايا الجذعية الجنينية بوسط إما أن يكون مشروطاً مشتملاً على الإنترلوكين 3- conditioned medium أو مؤشباً مشتملاً على الإنترلوكين 3- recombinant medium بمعدّل (2–11) نسيلة في كل تجربة ابتداءً من 10^6 خلية نقي عظم). وبالمقابل، فإننا لم نحصل على أية خلية من خلايا BMESL بدون إضافة الإنترلوكين 3-. لقد استعملنا هنا خلايا نقي عظم من وحيدات النوى، ولكننا لم نعلم ما هو الجزء المسؤول من هذه الخلايا عن الاندماج الخلوي التلقائي. إن الجزء (المشتمل على المورثة) $Scal^+ Lin^-$ لم يزدد خلال تواتر ظهور الخلايا الهجينة، مما يشير إلى أن الخلايا الجذعية المكونة للدم من غير المحتمل أن تكون مقحمة في عملية الاندماج الخلوي. ومن المعروف أن الاندماج الخلوي التلقائي يظهر في مستنبتات الخلايا البالغة مشكّلاً خلايا عملاقة متعددة النوى [22–24]. إن تشكّل خلايا عملاقة متعددة النوى في مستنبتات وحيدات النوى وتشكّل البلعميات في الزجاج يمكن تعزيزه بواسطة سيتوكينات متنوعة تشتمل على الإنترلوكين 3- [25]. إن جمع البالعات ووحيدات النوى أو أسلافها من هذه الخلايا في نقي العظم قد يكون مساهماً في عملية



الشكل 2– التحليل الوراثي لخلايا نقي العظم شبه الجذعية الجنينية BMESL: (a) الصيغة الصبغية لـ DNA، خلايا جذعية أبوية (ES) وخلايا نقي عظم شبه جذعية جنينية (النسيلة 1 والنسيلة 2 بعد أربعة أسابيع من الاستنسال) تمَّ تلوينها بيوديد البروبيديوم وأخضعت لتصنيف خلوي منشط الفلورة (تحليل FACS). (b) النمط النووي Karyotype (BMESL، نسيلة 1). (c) DNA متعدد الأشكال، استحصل على جينوم الدنا من خلايا جذعية جنينية، وخلايا نقي العظم (BM) وخلايا BMESL (النسيلتان 1 و 2). تمَّ تضخيم الدنا باستعمال مرئسات توابع دقيقة قادرة على كشف التعدد الشكلي بين جينوم نقي العظم وجينوم الخلية الجذعية الجنينية، ويجري الفصل على هلام آغاروز بنسبة 5% ويتم إظهارها باستخدام ملون بروميد الإثيديوم. تمَّ كشف الأنماط الجينية الهجينة 129/B6 في نسيلتي BMESL للصبغي 1 (D1MIT 15) والصبغي 9 (D9MIT 48) والصبغي 11 (D11MIT20) والصبغي 14 (D14MIT11) والصبغي 17 (D17MIT42) والصبغي 18 (D18MIT14).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

الاندماج الخلوي، وأخيراً فإن الفئران ذات البروتين المفلور الأخضر اللون GFP (tgN(GFPU) 5Nagy) كانت خالية من العوامل المرضة، وصحيحة الجسم، مما يشير إلى عدم إصابتها بفيروس Sendai القاتل.

ويتّضح، وفق ما حصلنا عليه من معلومات، أنه يمكن لخلايا نقي عظم الفأر أن تندمج تلقائياً مع خلايا أخرى، وبالتالي فإنها تتبنّى المظهر التكويني للخلايا المتلقية، وتكتسب هذه النتيجة أهمية خاصة تساهم في تعليل الأبحاث التي تتحدث عن خلايا نقي عظم مزدرعة تحولت في الوسط الحي إلى أنماط خلوية غير متوقعة [5–11]. تناقش هذه الدراسات التمايز الانتقالي على أساس وجود الصبغي Y (حينما يكون المعطي ذكراً والمتلقي أنثى) أو التعبير لمورثات نوعية خلوية لمعطٍ آخر.

من الممكن، بناءً على ماحصلنا عليه من نتائج، أن نُنشئ نظرية بديلة تقول باندماج خلايا نقي عظم المعطي مع خلايا جسمية في الوسط الحي وكذلك المساهمة في بعض خلايا النمط المانح ظاهرياً الموجود في مختلف الأعضاء.

وتجدر الإشارة إلى أن تكرار الاندماج الخلوي التلقائي كان منخفضاً جداً في هذه الدراسة (2–11 نسيلة في كل 10^6 خلية نقي عظم)، وتشير بعض دراسات الازدراع في الوسط الحي إلى حدوث تمايز انتقالي بحدود (30-50%) الأمر الذي يجعل من غير المحتمل أن تكون النتائج عائدة إلى حوادث الاندماج الخلوي. وعلى كل حال، فإن الخلايا المندمجة يمكن أيضاً أن تصبح المجموعة السائدة حينما تنمو أكثر من الخلايا الأبوية بجينات مشوهة ملحقة. إن إسهام الاندماج الخلوي في خلايا متمايزة انتقالياً في الظاهر، في الوسط الحي، هو مجرد تخمين ليس إلّا في الوقت الحاضر. وعلى كل حال، فإن معطياتنا تبرر تحذيراً للمتحمسين، فمن يعملون في مجال أبحاث الخلايا الجذعية عليهم ألّا تخلو استنتاجاتهم، بخصوص التمايز الانتقالي أو عودة التمايز، من فحص دقيق للأنماط الوراثية.

الطرائق

تحضير خلايا نقي العظم

تمّ الاستحصال على خلايا نقي العظم، من عظام أفخاذ إناث فئران محددة وراثياً يعبِّر عنها بروتين مفلور أخضر اللون (GFP)(TgN(GFPU)5Nagy –مختبرات جاكسون) [12]. تمّ تحضير خلايا نقي العظم وحيدات النوى بواسطة التثفيل التدريجي بطريقة Ficoll-Hypaque.

الاستنبات الخلوي

تمّ استنبات خط الخلايا الجذعية الجنينية R1 (سلالة 129/Sv) في أوعية استنبات نسيجية مغلفة بالجيلاتين تتضمن الوسط الاستنباتي التالي للخلايا الجذعية: DMEM (GIBCO) المشتمل على 15% FCS (Atlanta) و 2 مِلّي مول غلوتامين L-glutamine و 100 وحدة بنسلين/مل و 100 مكروغرام/مل ستربتومايسين و 25 مِلّي مول من الدارئة Hepes (GIBCO) و 300 مكرومول من غليسرول أحادي الكبريت mono-thioglycerol (Sigma) و 1000 وحدة /مل من العامل المثبط لابيضاض الدم LIF (ESGRO, CHMICON)، كما أسلفنا ذلك [13]. تمّ الحصول على الإنترلوكين –3 المؤشب من Pepro Tech أما البوروميسين فقد استحصل عليه من Sigma.

تمايز خلايا نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية BMESL في الزجاج

تمّ تمايز خلايا نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية الجنينية إلى خلايا جذعية جنينية في الزجاج، وفق ما وصفناه سابقاً [14, 15]. وباختصار، فقد تمّ تعليق خلايا نقي العظم المشار إليها أعلاه في وسط IMDM يشتمل على 2 مِلّي مول من الغلوتامين L- و 100 وحدة /مل بنسلين، و100 مكروغرام/مل من ستربتومايسين و 20% FCS و300 مكرومول من الغليسرول أحادي الكبريت (سيغما).

تمّت زراعة الخلايا لمدة يومين بطريقة القطرة المعلقة (1×10^3 من الخلايا الجذعية الجنينية في 30 مكرو لتر في كل قطرة). تمّ نقل الأجسام شبه الجنينية في القطرات المعلقة إلى وسط استنباتي معلق، في صحاف بتري واستنبتت لمدة ثلاثة أيام أخرى. وضعت الأجسام شبه الجنينية في ستة أطباق استنبات نسيجية لمزيد من التمايز.

عملية نسخ عكوسة للتفاعل التسلسلي للبوليميراز RT-PCR

استخلص مجمل الرنا RNA باستخدام عقيدة مائية للرنا RNA aqueous kit (Ambion). تمّ تركيب الدنا DNA المكمل من 2 مكروغرام من الكمية المستخصلة للرنا عن طريق تركيب السلسلة الثانية المكملة للأولى بإضافة النيكلوتيدات اللازمة للتركيب مع قليل من (dT) (GIBCO). إن مرئسات DNA primers لكل مورثة مشتقة من إكسونات exons مختلفة مما يؤكد أن حصيلة التفاعل التسلسلي للبوليميرات يمثل أنواع RNA الرسول وليس DNA الجينومي. لقد تمّ تطبيق هذا التفاعل التسلسلي للبوليميراز باستخدام بوليميراز Taq DNA (Eppendorf). وسيتم تلخيص تتالي DNA للمرئسات لاحقاً.

الصيغة الصبغية لـ DNA والتعدد الشكلي

يمكن تحديد كمية الدنا في كل خلية بتلوين الخلايا بملوّن يوديد البروبيديوم، ومن ثم اللجوء إلى عملية تحليل الخلايا المنشطة المتفلورة النوعية FACS.

تمّ الاستحصال على المجموع الجينومي للدنا من الخلايا الجذعية الجنينية، وخلايا نقي العظم، وخلايا نقي العظم الشبيهة بالخلايا الجذعية BMESL، كما تمّ تضخيم DNA باستخدام مرئسات توابع دقيقة microsatellite primers (D9MIT48, Research Genetics) لاكتشاف التعداد الشكلي بين جينوم نقي العظم (غالباً C57BL/6) وجينوم الخلية الجذعية الجنينية (129/Sv) عن طريق الفصل باستخدام هلام الآغاروز بتركيز 5% والتلوين بملون بروميد الإثيديوم.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

REFERENCES المراجع

[1] Weissman, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 287, 1442 - 1446 (2000).

[2] Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810-813 (1997).

[3] Clarke, D. L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 288, 1660- 1663 (2000).

[4] Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147 (1998).

[5] Ferrari, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, Science, 279, 1528-1530 (1998).

[6] Petersen, B. E. et. al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284, 1168-1170 (1999).

[7] Theise, N. D. et al. Liver from bone marrow in human. Hepatology 32, 11-16 (2000).

[8] Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nature Med. 6, 1229-1234 (2000).

[9] Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I. & Blau, H. M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 290, 1775- 1779 (2000).

[10] Mezey, E., Chandross K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 290, 1779-1782 (2000).

[11] Krause, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 105, 369-377 (2001).

[12] Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. & Nagy, A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells.Mech. Dev. 76, 79-90 (1998).

[13] Kawasome, H. et al. Targeted disruption of $p70^{56k}$ defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 5033-5038 (1998).

[14] Minamino, T. et al. MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell derived cardiac myocytes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 15127- 15132 (1999).

[15] Hamazaki, T. et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. FEBS Lett. 497, 15-19 (2001).

[16] Nichols, J. et. al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transciption factor Oct4. Cell 95, 379-391 (1998).

[17] Nishimoto,M., Fukushima, A., Okuda, A. & Muramatsu, M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTFI carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. Mol. Cell. Biol. 19, 5453-5465 (1999).

[18] Kawasaki, H. et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Neuron 28, 31-40 (2000).

[19] Everett, C. A. & West, J. D. The influence of ploidy on the distribution of cells in chimaeric mouse blastocysts, Zygote 4, 59-66 (1996).

[20] Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. & Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. Gurr. Biol. 11, 1553 - 1558 (2001).

[21] Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S. C. & Syrani, M. A. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. EMBO J. 16, 6510-6520 (1997).

[22] Parwaresch, M. R., Kreipe, H. & Radzun, H. J. Human macrophage hybrid forming spontaneous giant cells. Virchows Arch. B 51, 89-96 (1986).

[23] Chiozzi, P. et al. Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor. J. Cell Biol. 138, 697-706 (1997).

[24] Falzoni, S. et al. The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. J. Clin. Invest. 95, 1207 - 1216 (1995).

[25] Enelow, R. I., Sullivan, G. W., Carper, H. T. & Mandell, G. L. Induction of multinucleated giant cell formation from in vitro culture of human monocytes with interleukin-3 and interferon-β: comparison with other stimulating factors. Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 6, 57-62 (1992). ■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

خلايا نقي العظم ترمّم عضلة القلب المصابة بالاحتشاء*

جان كاجستيرا، ستيفانو شيمنتي، إيغور جاكونيك، بوشنغ لي، بيرناندو نادال – جينارد، أناروزا ليري، بيروأنفرسا
قسم الطب، الكلية الطبية – نيويورك – الولايات المتحدة الأمريكية
دونالد أورليك، ستاسي م. أندرسون، دافيد م. بودين
شعبة تكوُّن الدم، فرع الوراثة والبيولوجيا الجزيئية، NHGRL
جيمس بيكل، رونالد ميكي
مخبر البيولوجيا الجزيئية، NINDS, NIH، بيتشدا – ماريلاند 20892 – الولايات المتحدة الأمريكية

ملخص

يؤدي احتشاء العضلة القلبية إلى نقص نسيجي وتضرُّر في الأداء القلبي، حيث تعجز الخلايا العضلية المتبقية عن ترميم النسيج المتخّر، وهذا يؤدي إلى تدهور عمل القلب المصاب بالاحتشاء مع مرور الزمن [1]. تدرك الخلايا الجذعية stem cells البعيدة وجود أذية ما في عضوٍ هدف فتهاجر إلى موقع الضرر و تتمايز ضمنه [2–5]، الأمر الذي يؤدي إلى تعزيز الإصلاح البنيوي والوظيفي [6–8]. إن وجود هذه الدرجة الكبيرة من المرونة لدى الخلية الجذعية قادنا إلى التساؤل فيما إذا كان بالإمكان إعادة ترميم العضلة القلبية الميتة بازدراع خلايا نقي عظم ضمن العضلة القلبية لفئران مصابة باحتشاء قلبي. قمنا بفرز خلايا نقي عظم سالبة (Lin^-) مأخوذة من فئران محوَّرة وراثياً transgenic والمعبَّر عنها ببروتين ذي تفلور أخضر اللون [9] عند استخدام تقنية الفرز الخلوي المُفعّل بالفلورة المعتمدة على تعبيرية c-kit [10]. بعد مدة قصيرة من ربط الشرايين الإكليليّة coronary ligation، تمَّ حقن الخلايا $Lin^-c\text{-}kit^{POS}$ في الجدار المتقلّص المحيط بالاحتشاء. تبيّن بعد 9 أيام من ازدراع الخلايا النقوية بأن العضلة القلبية الحديثة التشكل قد شغلت 68% من الجزء المصاب بالاحتشاء من البطين. وتبيَّن أن النسيج المتطور يتضمن خلايا عضلية متكاثرة وبنى وعائية على حدٍ سواء. بيّنت دراساتنا بأن خلايا نقي العظم الموضعية المنشأ يمكن لها أن تولّد عضلة قلبية حديثة النشوء de novo، الأمر الذي يؤدي إلى تحسين حصيلة اعتلال الشرايين الإكليلية.

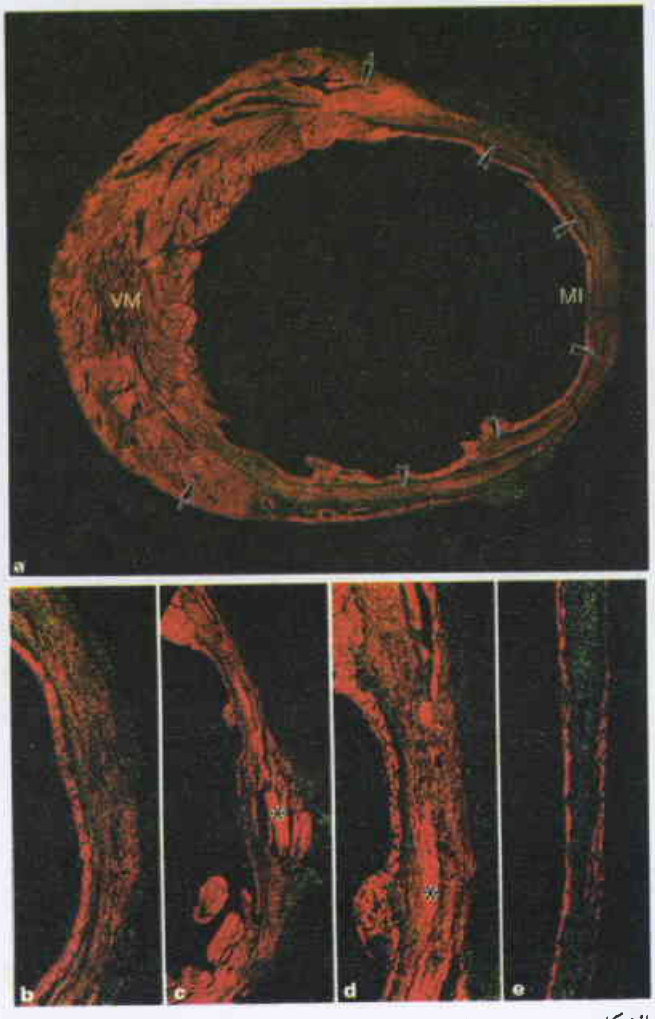
الكلمات المفتاحية: الشريان الإكليلي، احتشاء العضلة القلبية، خلايا جذعية، نقي العظم، الأوعية الإكليلية، تمايز، الانقسام الخلوي

أدّى حقن خلايا نقي العظم المأخوذة من ذكور الفئران $Lin^-c\text{-}kit^{POS}$ (عد لمعلومات إضافية) في المنطقة المحيطة بالاحتشاء من البطين الأيسر عند إناث الفئران إلى ترميم العضلة القلبية. حدث هذا الترميم عند 12 فأراً من أصل 30 فأراً (40%). يعود سبب فشل ترميم الاحتشاءات في الفئران المتبقية إلى صعوبة ازدراع الخلايا النقوية داخل النسيج القلبي المتقلّص بمعدل 600 ضربة في الدقيقة. إن التفاعل المناعي لمستضد معقد التوافق النسيجي الكبير موجود على الصبغي Y لخلايا نقي العظم للفئران العاطية، وقد أدّى أيضاً إلى فشلٍ في إحداث الترميم لدى بعض إناث الفئران المتلقّية. شغلت الخلايا العضلية $68 \pm 11\%$ من مجمل المنطقة المحتشية وامتدت من الوجه الأمامي إلى الوجه الخلفي للبطين (الشكل 1a-d). تبيّن أن جزء الشَغاف endocardium والتأمور المحددين للمنطقة المتراصّة والمحتشية [11،1] لم يختلف بين الفئران غير المعالجة، $78 \pm 18\%$ ($n = 8$)، أو الفئران المعالجة بخلايا Lin^- ($n = 12$) $75 \pm 14\%$ $c\text{-}kit^{POS}$ أو المعالجة بخلايا $Lin^-\ c\text{-}kit^{NEG}$ ($n = 11$) $75 \pm 15\%$. ولم نجد خلايا عضلية جديدة عند الفئران المحقونة بخلايا $Lin^-\ c\text{-}kit^{NEG}$ (الشكل 1e).

لقد تمَّ تحديد أصل خلايا العضلة القلبية المتشكّلة من خلال تعبير البروتين ذي التفلور المعزز الأخضر enhanced green fluorescent (EGFP) (الشكل 2) وبوجود الصبغي Y. ونجد في الخلايا القلبية الجديدة أن البروتين EGFP يبقى محصوراً في السيتوبلازما بينما يكون الصبغي Y محصوراً في النوى. لم تتم ملاحظة البروتين EGFP والصبغي Y في الجزء الحي من البطين. وترافق التعبير عن البروتين EGFP مع بروتينات نوعية للخلايا القلبية والخلايا البطانية والخلايا العضلية الملساء، مما يسمح لنا بتمييز كل الأنماط الخلوية القلبية والتعرُّف على الخلايا البطانية والخلايا العضلية الملساء المنظمة في الأوعية الإكليلية القلبية (الشكل 3a-c، انظر معلومات إضافية). كانت النسبة المئوية للخلايا القلبية الجديدة والخلايا البطانية والخلايا العضلية الملساء المعبّرة عن البروتين EGFP ($n = 7$) $53 \pm 9\%$ و ($n = 7$) $44 \pm 6\%$ و

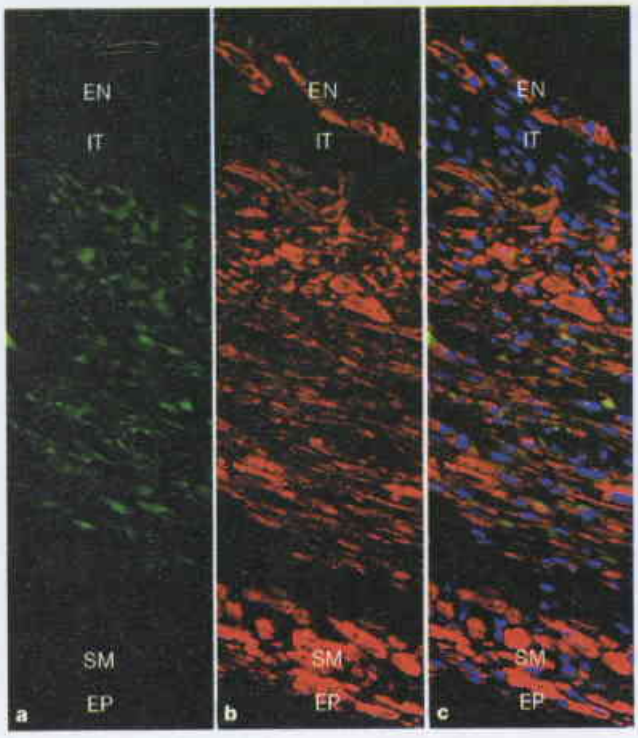
* نُشر هذا المقال في مجلة *Nature*, Vol.410, 5 April 2001. ترجمة الدكتور أيمن المريري – هيئة الطاقة الذرية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



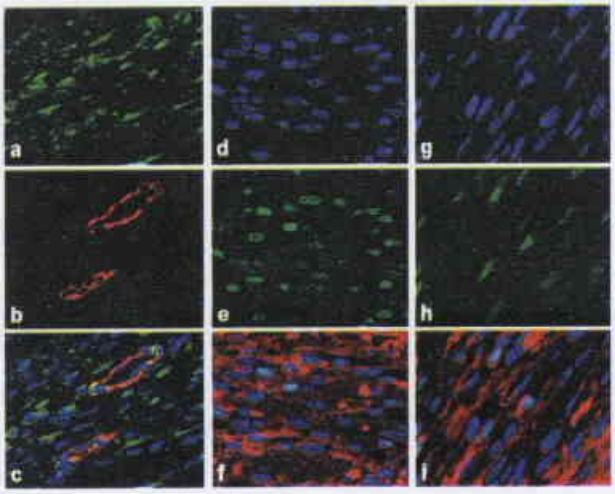
الشكل 1- خلايا نقي العظم وترميم عضلة القلب. (a) احتشاء العضلة القلبية (MI) المحقون بخلايا $\text{Lin}^{-}\ \text{c-kit}^{\text{POS}}$ المأخوذة من نقي العظم (الأسهم). تشير رؤوس الأسهم إلى عضلة القلب المرممّة، يشير الرمز VM إلى عضلة القلب الحية. (b) الاحتشاء السابق نفسه لكن بتكبير أعلى. (c, d) تكبيرات منخفضة وعالية للاحتشاء المحقون بخلايا $\text{Lin}^{-}\ \text{c-kit}^{\text{POS}}$. (e) الاحتشاء المحقون بخلايا $\text{Lin}^{-}\ \text{c-kit}^{\text{NEG}}$؛ ولا تظهر هنا إلا المنطقة الشافية. تشير علامة النجمة إلى الخلايا العضلية المتنخّرة. يشير اللون الأحمر إلى الميوزين القلبي، والأخضر إلى أيوديد البروبيديوم الملون للنوى. التكبير الأصلي المستخدم هو × 12 (a)، × 25 (c)، × 50 (b, d,e).

$49 \pm 7\% (n = 7)$ على التوالي. تتوافق هذه القيم مع الجزء المزدرع من الخلايا النقوية $\text{Lin}^{-}\text{c-kit}^{\text{POS}}$ والتي تعبّر عن البروتين EGFP $(n = 6)$ $44 \pm 10\%$. وجد أن معدّل الخلايا العضلية القلبية والخلايا البطانية والخلايا العضلية الملساء المعبّرة عن البروتين EGFP في قلب الفئران المانحة المحوَّرة وراثياً هو $(n = 6)$ $54 \pm 8\%$.



لإثبات أن الخلايا العضلية المتشكّلة حديثاً تمثل خلايا ناضجة قادرة على القيام بوظائفها، قمنا باختبار تعبير العامل المُعزز 2 للخلية العضلية myocyte enhancer factor 2 (MEF2)، وعامل الانتساخ النوعي القلبي GATA-4 cardiac specific tranacription factor، والواسمة المبكرة لتطور الخلية العضلية Csx/Nkx2.5. وفي القلب تحشد بروتينات MEF2

الشكل 2- احتشاء العضلة القلبية المحقون بالخلايا $\text{Lin}^{-}\ \text{c-kit}^{\text{POS}}$، يتم ترميم عضلة القلب بدءاً من الشغاف (EN) وحتى التأمور (EP). EGFP(a) (أخضر)، (b) ميوزين قلبي (أحمر)، (c) اتحاد EGFP والميوزين (أحمر - أخضر)، النوى الملونة بأيوديد البروبيديوم (أزرق). يمكن رؤية النسيج المصاب بالاحتشاء (IT) في منطقة تحت شغاف القلب، كذلك يمكن رؤية الخلايا العضلية المتبقية (SM) في منطقة تحت التأمور. التكبير الأصلي المستخدم هو × 250(c-a).



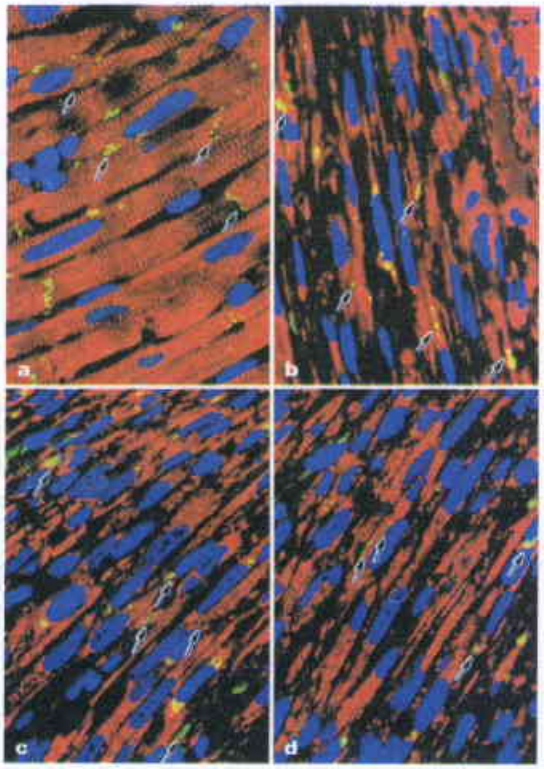
الشكل 3- عضلة قلبية مُرممّة في حال احتشاء محقون بخلايا $\text{Lin}\ \text{c-kit}^{\text{POS}}$. (a) EGFP (أخضر)، (b) ألفا أكتين العضلات الملساء في الشرينات (أحمر)، (c) اندماج EGFP وألفا أكتين العضلات الملساء (أصفر - أحمر)، والنوى الملونة بأيوديد البروبيديوم (PI) (الأزرق). (d-i) MEF2 و Csx/Nkx2.5 في الخلايا القلبية إيجابية الميوزين. (g-d)، نوى موسومة بـPI (الأزرق)، (h-e)، الوسم بـ MEF2 و Csx/Nkx2.5 (الأخضر)، (f-i)، ميوزين قلبي (الأحمر) والدماج MEF2 و Csx/Nkx2.5، و PI (تألق لامع في النوى). التكبير الأصلي، × 300(i-a).

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

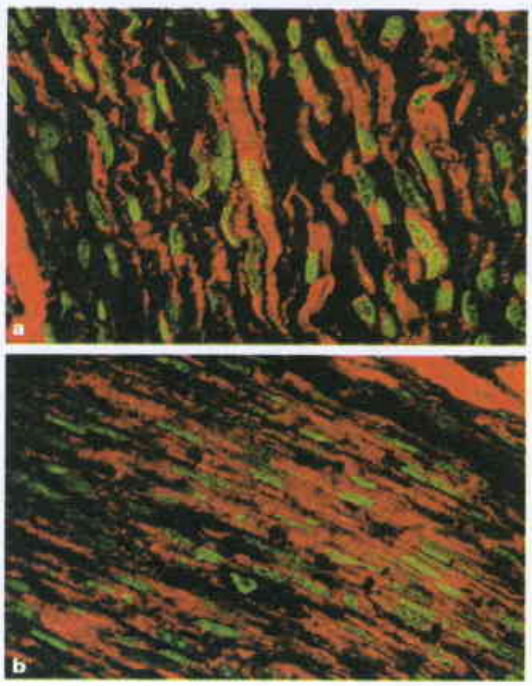
بواسطة عامل الانتساخ GATA-4 لتُفعل وبشكل تأزري العديد من حفّازات المورّثات القلبية، مثل السلسلة الخفيفة للميوزين، تروبونين T (troponin T)، تروبونين I، السلسلة الثقيلة ألفا للميوزين، ديسمين desmin، العامل الأذيني atrial natriuretic factor، والأكتين ألفا α-actin [12، 13]. إن العامل Csx/Nkx2.5 هو عامل نسخ مقيد بالأطوار الأولية لتمايز الخلية العضلية [12]. وفي القلب المعاد تكوينه تُعبر جميع نوى الخلايا الموسومة بالميوزين القلبي عن MEF2 (الشكل 3d-f) وعامل النسخ GATA-4 (معلومات إضافية)، لكن تعبيرها عن العامل Csx/Nkx2.5 يكون بنسبة 9%±40 فقط (الشكل3g-i).

لتحديد مزايا أخرى لهذه الخلايا العضلية، درسنا تعبير الكونيكسين 43 (Connexin 43)، حيث يعدُّ هذا البروتين مسؤولاً عن الاتصالات بين الخلوية وعن الربط الكهربائي عن طريق توليد قنوات بلازمية - غشائية بين الخلايا العضلية [14،15]. يبدو بروتين الكونيكسين 43 واضحاً في سيتوبلازما الخلية وعلى سطوح الخلايا المتمايزة المصفوفة بجانب بعضها البعض (الشكل 4). تتوافق هذه النتائج مع الكفاءة الوظيفية المتوقَّعة للنمط الظاهري للعضلة القلبية. إضافةً إلى ذلك، فقد تمَّ الكشف عن وجود خلايا عضلية في مراحل مختلفة من النضج ضمن عصائب متشابهة ومختلفة (الشكل 5).

يُعبر عن ki67 في خلايا ضمن الدارة الخلوية في الأطوار G2, S, G1 وخلال الانقسام الخلوي المبكر [16]، مما يزوّدنا بتقييم كمي عن نسبة



الشكل 4- ترميم العضلة القلبية والكونيكسين 43. (**a**) المنطقة المحيطية، (**d-b**) عضلة القلب المُرمَّمة. يبدو الكونيكسين 43 (الأصفر-الأحمر، حيث تشير الأسهم إلى الاتصالات بين الخلايا العضلية) ويبدو الألفا أكتين العضلي (الأحمر)، والنوى الملونة بـ PI (الأزرق). التكبير الأصلي، 500 × (a) ويصل حتى 800 × (b-d).



الشكل 5- عضلة قلبية مُحتشية محقونة بالخلايا $Lin^- c\text{-}kit^{POS}$، وتبدو فيه الخلايا العضلية المُرمَّمة، حيث يظهر الميوزين القلبي (الأحمر)، والنوى الملونة بـ PI (الأصفر - الأخضر). التكبير الأصلي = 1000 × (**a**)، وللقسم 700 × (**b**).

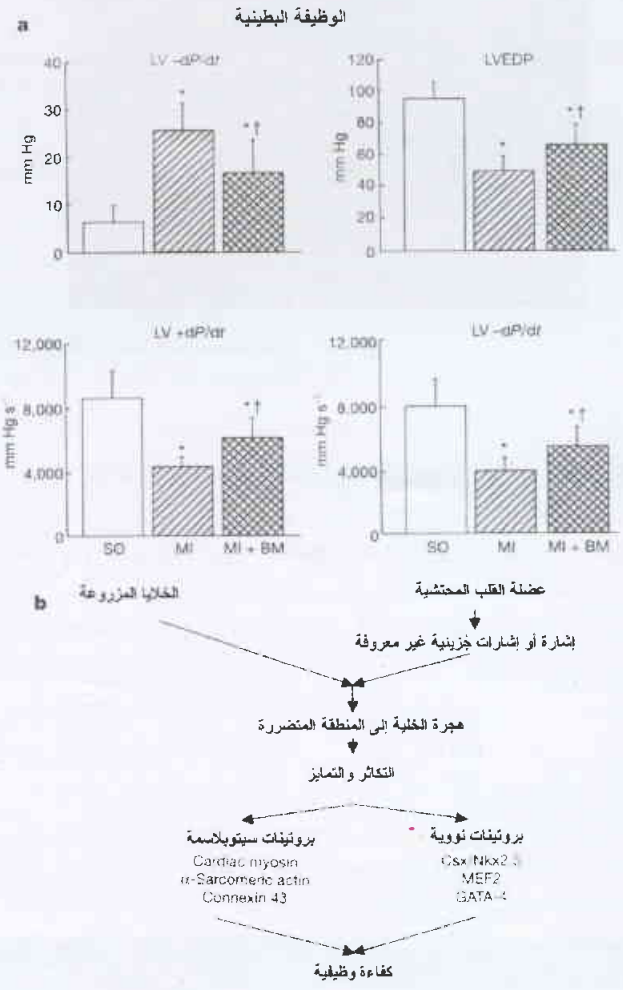
الخلايا الداخلة في الدارة الخلوية خلال زمن الملاحظة. بما أن الوسم ببرومو دي أوكسي يوريدين -5(BrdU) يُميِّز النوى في الطور S [17،16]، لذلك قمنا بحقن BrdU لمدة 4 - 5 أيام لتقدير الانقسام الخلوي التراكمي خلال النمو الفعَّال (معلومات إضافية). لقد كان تكاثر الخلايا العضلية أعلى بنسبة 93%(P<0.001)، و60%(P<0.001) من تلك الملاحظة في الخلايا البطانية؛ وأعلى بنسبة 225%(P<0.001) و176%(P<0.001) من تلك الملاحظة في الخلايا العضلية الملساء، وذلك عند القياس بواسطة BrdU وki67 على التوالي (BrdU: للخلايا العضلية 8%±36، وللخلايا البطانية 5%±19 وللخلايا العضلية الملساء 2%±11، ki67: للخلايا العضلية 3%±19 وللخلايا البطانية 3%±12 وللخلايا العضلية الملساء 2%±7, n=8 في كل الحالات). كانت الخلايا العضلية المنقسمة صغيرة وذات ليفات عضلية جزئية الاصطفاف، مماثلة للخلايا الجنينية المتأخرة / والخلايا حديثة الولادة، وعبرّت 40-50% من الخلايا إيجابية الـ ki67 أو الـ BrdU عن EGFP.

أحدث التمايز الخلوي نقصاً في مستقبلات السطح c-kit. لاحظنا فقط وجود خليتين غير متمايزتين أظهرتا c-kit على الغشاء الخلوي للخلايا تحت البطانية في الجدار العضلي المصاب بالاحتشاء. وُجدت هذه الخلايا الموسومة بـ c-kit بجوار العصابة المرمَّمة ولكن ليس ضمنها، معبّرة عن EGFP مما يؤكد أن مصدرها من الخلايا النقوية المزدرعة (معلومات إضافية).

ولتحديد فيما إذا كان للخلايا العضلية المطوَّرة والمشتقة من الخلايا $Lin^- c\text{-}kit^{POS}$ تأثيرات على الوظيفة القلبية، تمَّ الحصول على معلومات

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

ديناميكية دموية قبل الموت. كانت النتائج عند الفئران المصابة باحتشاء العضلة القلبية غير المحقونة بالخلايا سلبية $Lin^{-}c\text{-}kit^{NEG}$ أو المحقونة بهذه الخلايا متوافقة. وبالمقارنة مع الفئران غير المعالجة، أظهرت الفئران المصابة باحتشاء قلبي علامات القصور القلبي (الشكل 6a). ولُوحظ في الفئران المعالجة بالخلايا إيجابية $Lin^{-}c\text{-}kit^{POS}$ انخفاض في ضغط نهاية الانبساط في البطين الأيسر بنسبة 36%، وارتفاع في الضغط المطوَّر (LVDP) وLV + dp/dt وLV- dp/dt بنسبة 32%، 40%، و 41% على التوالي مقارنة بالفئران المحقونة بالخلايا سلبية $Lin^{-}c\text{-}kit^{NEG}$.



الشكل 6- الآلية التي يتم فيها ترميم العضلة القلبية وتأثيراتها على وظيفة البطين. (a) تأثيرات احتشاء العضلة القلبية (MI) على نهاية الانبساط للبطين الأيسر (LVEDP)، الضغط المتطور (LVDP),LV + dp/dt (معدّل ازدياد الضغط) وLV-dp/dt (معدّل انخفاض الضغط). تؤخذ النتائج من الفئران غير المعالجة (SO,n = 11): الفئران غير المحقونة بخلايا $Lin^{-}c\text{-}kit^{POS}$ (عدد الإصابات بالاحتشاء 5 = n)، للفئران المحقونة بخلايا $Lin^{-}c\text{-}kit^{NEG}$، و6 = n لغير المحقونة)؛ والفئران المحقونة بخلايا Lin^{-} $c\text{-}kit^{POS}$ (MI + BM, n = 9). تمّ التعبير عن القيم بالقيمة المتوسطة ± الانحراف المعياري؛ الرمز * يشير إلى أن $P<0.05$ مقارنة بالفئران غير المعالجة، والرمز † يشير إلى $P<0.05$ مقارنة بالفئران المصابة باحتشاء عضلة قلبية. (b) الشكل المقترح لتمايز الخلية Lin^{-} c-kit^{POS} في العضلة القلبية وتأثيراتها الوظيفية.

أبدت خلايا نقي العظم $Lin^{-}c\text{-}kit^{POS}$ المزدرعة موضعياً قدرة عالية على تمايز النسيج القلبي، حيث أدّت إلى تشكيل خلايا عضلية وخلايا بطانية وخلايا عضلية ملساء جديدة مولّدة العضلة القلبية من جديد de novo، بما فيها الشرايين الإكليلية، الشرينات والشعيرات الدموية. يقتضي الترميم الجزئي للقلب المصاب باحتشاء حدوث استجابة للخلايا المزدرعة للإشارات المنبعثة من عضلة القلب المتأذية والتي تحرض هجرتها وتكاثرها وتمايزها ضمن المنطقة المنخورة من جدار البطين (الشكل 6b).وتُعبر هذه الخلايا العضلية المتمايزة عن بروتينات نووية وسيتوبلازمية خاصة بالنسيج القلبي. كما يُشير وجود نقاط الكونيكسين 43 إلى الارتباط الخلوي والكفاءة الوظيفية لعضلة القلب المرمَّمة (الشكل 6b). وخلال النضج بعد الولادي، تأكدت وظيفة الخلايا الجذعية مسبقاً لتنحصر بالسلالات الخلوية الموجودة في العضو الذي اشتقت منه. لكن الدراسات التي أظهرت أن الخلايا الجذعية لنقي العظم وللجملة العصبية يمكن أن تنتج العديد من الأنماط الخلوية شكّلت تحدّياً لفكرة محدودة المقدرة التمايزية للخلايا الجذعية [4،5، 18-20]. أظهرنا وللمرة الأولى، أن تحت جماعة من خلايا نقي العظم البدائية رممت العضلة القلبية في الحي، آخذةً مكان النسيج الميت.

تحمل الخلايا الجذعية المشكّلة للدم (HSCs)، والأورمات الميلانينية المشتقّة من العرف العصبي، والخلايا المنشأة البدائية c-kit على غشائها الخلوي. تهاجر هذه الخلايا البدائية خلال مرحلة التطور الجنيني مستوطنة الكيس المحي yolk sac والكبد. وكلا هذين العضوين إيجابي لـ RNA الرسول المرمز لعامل الخلية الجذعية (SCF) والذي هو ربيطة لـ c-kit [21]. يُعتقد أن SCF المرتبط بالغشاء يتوسط هجرة HSC وخلايا بدائية أخرى إلى أعضائها الهدف [22]. وإن قلوب الأجنّة وحديثي الولادة موجبة مستنسخات SCF [21]، ومع أنه من غير الواضح فيما إذا كانت خلايا القلب البالغ تولد SCF فإن طريق c-kit/SCF من الممكن أن يُمثل الآلية التي من خلالها، وفي شروط تجربتنا، تكون الخلايا $Lin^{-}c\text{-}kit^{POS}$ المزدرعة قد هاجرت من موقع الحقن إلى عضلة القلب المحتشية.

عندما تنقسم خلية جذعية، تتشكل خليتان بنتان، قد تحافظان على خصائص الخلية الجذعية أو تصبحان خليتين متمايزتين [23] تتكاثران بسرعة أكبر بكثير من تكاثر الخلايا الجذعية [24]. أنتجت الخلايا $Lin^{-}c\text{-}kit^{POS}$ في هذه الازدراعات الأنماط الخلوية الرئيسية الثلاثة للقلب وهي الخلايا العضلية التي تمثّل الجزء الأكثر سيادة والأكثر فعالية في ترميم عضلة القلب، والخلايا البطانية والخلايا العضلية الملساء وكلاهما أسرع نمواً ولكن بنسبة أصغر ضمن النسيج المتطور. من الصعب مقارنة نتائجنا بنتائج الدراسات المجراة على جرذان تم تخريب قلبها بالبرودة بعد حقن خلايا عضلية مستنبتة مشتقة من خلايا نقوية عظمية متوسطة [25]. وفي هذه الدراسة الأخيرة يكون من الضروري تشكيل الأنيبيبات العضلية في الزجاج من أجل الوصول إلى ازدراع ناجح [25]، وهذا ما يتعارض مع نتائجنا. لاتنطبق الدراسات المجراة بواسطة التخريب بالبرودة على الإنسان، وإنما قد تُحدث ضرراً غير عادي رغم وجود دوران إكليلي سليم كلياً. وهذا قد يُفسر تمكن بعض الخلايا البطانية فقط من الارتباط بالمستنبت الأصلي [25] بينما لايمكن ملاحظة أي خلية عضلية ملساء. والتباين الآخر مع نتائجنا يتمثل في حقيقة أنه لا يمكن أن يحل نسيج وظيفي فعّال مكان العضلة القلبية المتضرّرة.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

يُعدُّ داء القلب الإكليلي مسؤولاً عن حوالي 50% من مجمل الوفيات الناجمة عن إصابات وعائية قلبية، وعن 40% تقريباً من حالات القصور القلبي. زوَّدتنا النتائج الحالية بدليل ضروري يثبت إمكانية تطبيق طريقتنا من أجل معالجة الأمراض عند الإنسان. وتَعرِضُ خلايا نقي العظم البدائية المزدرعة موضعياً معالجة ناجحة لاحتشاءات عضلة القلب الواسعة الناجمة عن موت الخلايا القلبية بنقص التروية. قلَّلت هذه المعالجة من المساحة المحتشية وحسَّنت الحركيات الدموية للقلب. ويُعتبر حجم الاحتشاء مُحدداً رئيسياً للإمراضيات وللوفيات، حيث تترافق الاحتشاءات الضخمة المؤثرة على 40% أو أكثر من حجم البطين الأيسر مع حدوث صدمة قلبية المنشأ أو مع تطور سريع لقصور قلب احتقاني [1]. وفي الماضي كان تحسُّن الوظيفة القلبية يعتمد بشكل كلي على نمو الجزء غير المحتشي المتبقي من البطين. ومهما يكن، يعاني القلب المحتشي المتضخم من تدهور متقدِّم مؤدياً إلى حدوث اعتلال عضلي توسعي، وقصور بالمرحلة النهائية وبالتالي الموت [1]. تملك خلايا نقي العظم Lin⁻ c-kit^{POS} المزدرعة القدرة على ترميم مناطق مهمَّة من عضلة القلب المتقلصة. ويمكن لهذا الشكل الجديد من الترميم أن يُحسِّن المظاهر الآنية والبعيدة الأمد لاعتلال عضلة القلب الإقفاري "بنقص التروية".

الطرائق

الخلايا Lin⁻c-kit^{POS}

تمَّ جمع نقي العظم من عظم الفخذ وعظم الظنبوب لذكور الفئران المحوَّرة وراثياً المعبرة عن البروتين EGFP [9]. عُلقت الخلايا في وسط PBS المحتوي على 5% من مصل جنين البقر (FCS) ومن ثم حُضنت في الثلج بوجود الأضداد وحيدة النسيلة ضد الفئران المأخوذة من الجرذان والنوعية للسلالات المكونة للدم التالية: الخلايا اللمفاوية التائية (CD4, CD8)، الخلايا اللمفاوية البائية (B-220)، البالعات الكبيرة (Mac-1)، الخلايا الحبيبية (GR-1)، والكريات الحمراء (TER-119)، من pharmingen. ثم يتمُّ غسل الخلايا بـPBS وحضنها لمدة 30 دقيقة مع حبيبات ممغنطة مشتقة من الماعز goat anti-rat immunoglobulin ومغطاة بالغلوبلين المناعي ضد الجرذ، ومن ثم تتم إزالة الخلايا إيجابية السلالة المتبقية بواسطة المغنطة الحيوية بينما يتم تلوين الخلايا السالبة المتبقية 10%(Lin⁻) بالبيوتين ACK-4-biotin (ضد وحيد النسيلة ضد c-kit). غُسلت الخلايا بـPBS، ثم لُونت بالستربتافيدين المرتبط بفيكوايرثرين streptavidin-conjugated phycoerythrin (SA-PE) والتي تفرز بواسطة جهاز القياس الخلوي بالتدفق (FACS) مُستعملين النوع FACS Vantage (Becton Dicknson). تمَّ تهييج EGFP و ACK-4-biotin-SA-PE بطول موجة 488 نانومتر. تمَّ فرز الخلايا Lin⁻ كخلايا موجبة (c-kit^{POS}) وكخلايا سالبة (c-kit^{NEG}) بتباين لوغاريتمي من 1-2 log في كثافة التلوين. عُلقت الخلايا c-kit^{POS} بتراكيز من 3×10^4 إلى 2×10^5 خلية في 5µl من PBS، وعُلقت الخلايا c-kit^{NEG} بتراكيز من 5×10^4 إلى 5×10^5 خلية في 5µl من PBS [10].

احتشاء العضلة القلبية

إحداث احتشاء في العضلة القلبية لدى إناث الفئران من النمط C57BL/6 بأعمار شهرين بالطريقة الموصوفة سابقاً [11]. بعد 3 إلى 5 ساعات من حدوث الاحتشاء، تتم إعادة فتح الصدر وحقن 2.5µl من PBS المحتوي على الخلايا Lin⁻c-kit^{POS} وذلك في الوجه الأمامي والخلفي من العضلة القلبية الحية المحيطة بالاحتشاء. استخدمت الفئران المحتشية غير المحقونة أو المحقونة بالخلايا Lin⁻c-kit^{NEG} والفئران غير المعالجة كشواهد. تمَّ قتل الحيوانات جميعها بعد 2±9 يوم من العمل الجراحي. تمَّ تثبيت بروتوكولات العمل من قبل الهيئة المرجعية للمخابر.

الوظيفة البطينية

تمَّ تخدير الفئران بكلورال الهدرات chloral hydrate (400 ملغ/كغ)، وتمَّ وضع قثطرة في المنطقة داخل البريتوان (i.p.) وفي الشريان السباتي الأيمن right carotid artery مزوَّدة بناقل للضغط ذي رأس مستدقة (model SPR-671) من أجل قياس ضغط البطين الأيسر و LV + والـ LV - dp/dt في التحضيرات بعد القيام بإغلاق الصدر. تمَّت قثطرة الأبهر البطيني abdominal aorta وتمَّ إيقاف القلب في وضعية الانبساط وتغذية العضلة القلبية بشكل تراجعي باستخدام موقي الفورمالين 10% formalin buffered [11 – 26]. يتم تلوين ثلاثة مقاطع نسيجية مأخوذة من قاعدة البطين الأيسر إلى ذروته left ventricle بالهيماتوكسلين haematoxylin والإيوزين eosin. بعد 2±9 يوم من انسداد الشريان الإكليلي يمكن تحديد الجزء المحتشي من البطين بسهولة (انظر الشكل 1a). في كل مقطع من المقاطع نقوم بقياس أطوال السطح تحت الشغاف وسطح التأمور المحددين لمنطقة الاحتشاء، ومساحة الشغاف والتأمور لكامل البطين الأيسر؛ ومن ثم يُحسب حجم الاحتشاء المتوسط في كل حالة على حدة، مترافقة بتكبير 4× باستخدام محلل صور متَّصل بالمجهر [11].

كشف التكاثر الخلوي و EGFP

لإثبات فيما إذا كانت الخلايا Lin⁻ c-kit^{POS} قد أفضت إلى إعادة ترميم العضلة القلبية، قمنا بحقن BrdU (50 ملغ/كغ من وزن الجسم داخل البريتوان) يومياً لمدة أربعة إلى خمسة أيام متتالية قبل قتل الفئران. تمَّ حضن المقاطع مع أضداد ضد BrdU ومن ثم أُجري قياس الخلايا القلبية الموسومة به [17]. أيضاً تمَّ تقدير تعبير ki67 في النوى بمعالجة العينات بأضداد متعددة النسيلة ضدki67 للفأر مأخوذة من الأرنب. تمَّ استخدام ضد IgG- للأرنب المأخوذ من الماعز الموسوم والمرتبط بفلوريسين إيزوتيوسيانات (FITC) كضد ثانوي؛ أما EGFP فقد تمَّ كشفه باستخدام الأضداد متعددة النسيلة ضد GFP- المأخوذة من الأرنب (مسابر جزيئية). مُيِّزت الخلايا العضلية باستخدام أضداد وحيدة النسيلة ضد السلسلة الثقيلة للميوزين القلبي المأخوذ من الفأر (MAB 1552; Chemicon)، أو باستخدام الأضداد وحيدة النسيلة ضد القطعة العضلية sacromeric ألفا أكتين المأخوذة من الفأر (نسيلة 5C5، سيغما)؛ ومُيِّزت الخلايا البطانية باستخدام أضداد الأرنب متعددة النسيلة ضد العامل VIII الإنساني (سيغما) والخلايا العضلية الملساء باستخدام أضداد وحيدة النسيلة للفأر ضد ألفا أكتين العضلات الملساء (نسيلة IA4، سيغما). لُوِّنت النوى بـ 10 µg ml^{-1} من الأيوديد بروبيديوم propidium iodide [28, 27]. قمنا بتحديد نسبة النوى الملونة للخلايا العضلية (M)، والخلايا البطانية (EC)، والخلايا العضلية الملساء (SMC) باستخدام

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

BrdU وki67 بواسطة المجهر المتحد البؤر ويتم الوصول لهذه النسبة بتقسيم عدد النوى الموسومة إلى العدد الكلي للنوى المدروسة. كان عدد عينات النوى في كل مجموعة مدروسة كالتالي؛ عند الوسم بـ BrdU: M=2.908;EC=2.153;SMC=4.877، وسم بـki67: SMC=4.752 وEC=4.051 وM=3.771. أما عدد الخلايا الموسومة بـ EGFP: M=3.278, EC=2.056, SMC=1.274. تمَّ تحديد نسبة الخلايا العضلية في عضلة القلب المُرمّمة من خلال تحديد المساحة المشغولة بالخلايا الملونة بالميوزين القلبي وتقسيمها من على المساحة الكلية والمعبر عنها بمساحة لمنطقة الاحتشاء في كل حالة على حدة.

الصبغي Y

لدراسة الفلورة باستخدام مقايسة التهجين hybridization في المواضع in situ، عرضنا المقاطع لمحاليل النزع التي تحتوي على 70% من فورم أميد formamide. بعد نزع الماء بواسطة الإيتانول تمَّ تهجين المقاطع باستخدام مسبر الدنا CEP Y (satellite III) ذي طيف أخضر (Vysis) لمدة ثلاث ساعات [29]. ثم لُونت النوى بأيوديد البريديوم.

عوامل الانتساخ والكونيكسين 43

حُضنت المقاطع مع أضداد الأرنب متعددة النسيلة ضد MEF2 (SantaCruz, C-21)، أضداد الأرنب متعددة النّسيلة ضد GATA-4 (Santa Cruz,H-112)، أضداد الأرنب متعددة النسيلة ضد Csx/Nkx2.5 (من Dr. S. Izumo) وأضداد الأرنب متعددة النسيلة ضد الكونيكسين 43 (سيغما). استخدمنا أضداد الأرنب ضد IgG المأخوذة من الماعز والمرتبطة بـ FITC (سيغما) كأضداد ثانوية [30].

التحليل الإحصائي

قُدمت النتائج على شكل متوسطات ± عدد الانحرافات المعيارية، وتمَّ تحديد وجود اختلاف مهمٍّ بين قياسين باستخدام اختبار ستيودنت Student's t-test. بينما تم استخدام طريقة بويفيرني عند القيام بدراسة الاختلافات بين مجموعات متعددة. قمنا باعتبار وجود اختلاف مهمٍّ حسب جميع الطرائق الإحصائية عندما تكون $P<0.05$.

المراجع REFERENCES

[1] Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. ventricular remodeling after myocardial infarction. Circulatoin 81, 1161-1172 (1990).

[2] Ferrari, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279, 1528-1530 (1998).

[3] Jackson, K. A., Mi, T.& Goodell, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc natl Acad. Sci. USA 96, 14482-14486 (1999).

[4] Eglitis. M. A. & Mezey, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macrogelia in the brains of adutl mice. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 4080-4085 (1997).

[5] Theise, N. D. et al. Liver from bone marrow in humans. Hepatology 32, 11-16 (2000).

[6] Brazelton, T. A., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I. & Blau, H. M. from marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 290, 1775-1779 (2000).

[7] Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A.& Mckercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 290, 1779-1782 (2000).

[8] Vogel, G. Stem cells: new excitements, persistent questions. Science 290, 1672-1674 (2000).

[9] Hadjantonakis, A. k. Gerstenstein, M. Ikawa, M., Okabe, M. & Nagy, A. Generating green fluorescent mice by gremline transmission of green fluorescent ES cells. Mech. Dev. 76, 79-90 (1998).

[10] Orlic, D. Fischer, R, Nishikawa, S.- I., Nienhuis, A.W. & Bodine, D. M. Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopietic stem cell population expressing high levels of c-kit receptor. Blood 82, 762-770 (1993).

[11] Li, Q. et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. J. Clin. Invest. 100, 1991-1999 (1997).

[12] Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R. J. & Nemer, M. the cardiac transciption factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. EMBO J. 16, 5678-5696 (1997).

[13] Morin, S., Charron, F., Robitaille, L. & Nemer, M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. EMBO J. 19, 2046-2055 (2000).

[14] Beardsle, M. A., Laing, J.G., Beyer, E. C.& Saffitz, J. E. Rapid turnover of connexin 43 in the adult rat heart. Circ. Res. 83, 629-635 (1998).

[15] Musil L. S., Le, A. N., Vanslyke, J. K. & Roberts, L. M. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. J. Biol .chem. 275, 25207-25215 (2000).

[16] Scholzen, T. & Gerdes, J. The ki-67 protein: from the known and unknown. J. cell. physiol.182, 311-322 (2000).

[17] Kajstura, J. et al. Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. Circ. Res. 74, 383-400 (1994).

[18] Clarke, D. L. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 288,1660-1663 (2000).

[19] Theise, N. D. et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology 31, 235-240 (2000).

[20] Lagasse E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nature Med. 6, 1229-1234 (2000).

[21] Kunisada T. et al. Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. Development 125, 2915-2923 (1998).

[22] Matsui Y., Zsebo K. M. & Hogan, B. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the S1 locus and the ligand for c-kit. Nature 374, 667-669 (1990).

[23] Morrison, S. J., Uchida, N. & Weissman, I. L. The biology of hematopoitetic stem cells. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11, 35-71 (1994).

[24] Morrison, S. J., shah, N. M. & Anderson, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88, 278-289 (1997).

[25] Tomita, S. et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation 100 (Suppl.), II-247-II-256 (1999).

[26] Li, B. et al. Insulin-like growth factor-I attenuates the detrimental impact of non occlusive coronary artery constriction on the heart. Circ. Res. 84, 1007-1019 (1999).

[27] Leri, A. et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. J. Clin. Invest.101, 1326-1342 (1998).

[28] Kajstura, J. et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 8801-8805 (1998).

[29] Kajstura, J. et al. Telomere shortening is an in vivo marker of myocyte replication and aging. Am. J. Pathol.156, 813-819 (2000).

[30] Leri, A. et al. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes. Circulation 97, 194-203 (1998).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

الخلايا الجذعية في النسج الظهارية*

ج. م. و. سلاك
قسم البيولوجيا والكيمياء الحيوية - جامعة باث - المملكة المتحدة

ملخص

تحتوي معظم، إن لم يكن جميع، النسج الظهارية على خلايا جذعية. وتكون هذه الخلايا مسؤولة عن التجديد أو الترميم الطبيعي للنسج بعد أي تخريب فيها. وإن معرفتنا الحالية لخصائصها محدودة ومستقاة من دراسات الحركيات الخلوية ومن التحليل النسيلي.

الكلمات المفتاحية: نسيج ظهاري، خلايا جذعية، خلايا سلف، لدونة.

يتألف نحو 60% من أنماط الخلايا المتمايزة في جسم كائن حي ثديي من الظهارات [1]. وإن مجال وظائفها واسع ويشمل غالباً إفراز مواد فعّالة حيوياً وامتصاص مواد أخرى بالإضافة إلى تشكيل مضامين آلية للسطوح. إن كيفية تشكيل الظهارات والمحافظة عليها هي إحدى المشاكل المفتاحية في بيولوجيا التشكل وهي حقل لاتزال فيه الكثير من الأسئلة الأساسية بدون حل. تبدي بعض الظهارات، مثل ظهارة الجلد أو المعي، استبدالاً خلوياً سريعاً [2، 3]، بينما يبدي بعضها الآخر كظهارة الكبد أو البنكرياس استبدالاً بطيئاً جداً في الشروط الطبيعية ولكنها تبدي تكيُّفاً خاصاً للتجديد [4-6].

وبذلك فإنه من المحتمل أن تؤكد جميع الظهارات احتواءها على خلايا قادرة على إعادة استيطانها، إما من خلال الحياة الطبيعية للفرد أو على الأقل تحت ظروف الترميم والإصلاح النسيجي. ولقد اعتُمدت تعريفات متنوعة "لخلية جذعية" من قبل كتّاب متنوعين، ولكن من الواضح أن تعريفاً متفقاً عليه يتضمن فكرتين على الأقل: حيث تستطيع الخلايا الجذعية توليد نفسها طيلة حياة الحيوان، كما أنها تستطيع إعطاء خلايا متمايزة differentiated cells [7]. يضاف إلى ذلك فكرة ثالثة تقول بأن الخلايا الجذعية غير متمايزة undifferentiated ظاهرياً. بيد أن هذا التعريف يقصي بعض الجماعات الخلوية cell populations التي توصف غالباً بأنها خلايا جذعية، مثل خلايا الطبقة القاعدية لبشرة الجلد وخلايا قنوات البنكرياس والقنوات الصفراوية. كما يُعتقد غالباً أن الخلايا الجذعية تعاني من انقسام غير متناظر إجباري معطية خلية بنتاً جذعية وخلية بنتاً أخرى مصيرها التمايز. ربما يكون ذلك صحيحاً في بعض الحالات، ولكن قد لا تكون هذه الميزة ضرورية لأن جماعة الخلايا الجذعية لاتزال قادرة على المحافظة على ذاتها عندما يعطي انقسام خلوي لواحدة منها خليتين بنتين جذعيتين، ويعطي انقسام خلية جذعية أخرى خليتين بنتين تدخلان في تمايز خلوي.

تحديد الخلايا الجذعية

بغضّ النظر عن بعض الاستثناءات التي ستناقش فيما بعد، تعدُّ الخلايا الجذعية الظهارية محددة تطورياً أي تستطيع تشكيل الخلايا المتمايزة الخاصة بنمطها النسيجي وليس تشكيل خلايا نمط نسيجي آخر. وفي دراسات المراحل المبكرة من التطور الجنيني، اعتدنا على فكرة أن التحديد أثناء التطور الجنيني مرمز بتشكيلة من عوامل الاستنساخ المورثي [8]. ويفترض أن يكون ذلك صحيحاً بالنسبة للخلايا الجذعية الظهارية، ولكن وبسبب صعوبة الوصول إليها وصعوبة عزلها من أجل التجريب عليها، فإنه لايوجد حالياً نمط يمكن تمييزه عن طريق تشكيلة من عوامل الاستنساخ.

ليس الانقسام الخلوي، بحدّ ذاته، مؤشراً لحالة خلية جذعية. ولقد وضّحت دراسات الحركية الخلوية أن الخلايا الجذعية بطيئة الانقسام عادة وأن معظم الخلايا المنقسمة في نسيج ما عبارة عن "خلايا مكاثرة انتقالية transit amplifying cells" محددة للتمايز بعد عدد من الانقسامات [2، 9]. إن وجود خلايا مكاثرة انتقالية يعني أن النسيج المعني يستطيع المحافظة على محصول مرتفع من الخلايا المتمايزة بدءاً من عدد صغير من الخلايا الجذعية.

هناك بعض المميزات الخاصة بالخلايا الجذعية للبشرة الجلدية، حيث تبين أنها تحمل سويات مرتفعة من جزيئات اللصوقية الخلوية على سطوحها كما أنها تحتوي على سوية مرتفعة من B-Catenin [10-12]. وفي جراب الشعرة، ذُكِر cytokeratin 15 كواسم للخلايا الجذعية [13]. وفي المعي الدقيق، تفشل السلالة الفأرية الصرعية knock out mice الطافرة بالعامل TCF4 في تشكيل حجيرة تكاثرية [14]. إن TCF4 عبارة عن عامل استنساخ لصندوق مجموعة الحركة الكبرى مرتبط في حالته الطبيعية مع B-Catenin استجابة للعامل المشير Wnt وبذلك يبدو مهماً أن تلعب عناصر Wnt دوراً في نمطين مختلفين من الخلايا الجذعية.

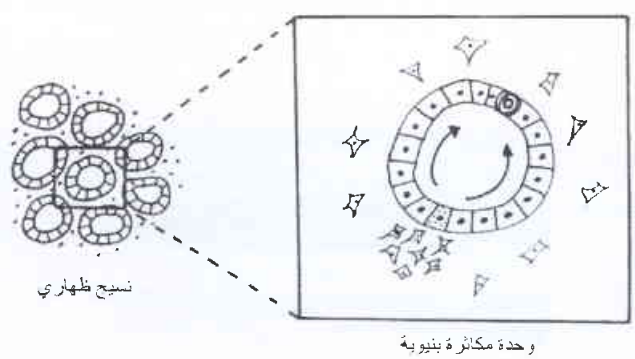
* نشر هذا المقال في مجلة *Science*, Vol.287, 25 February 2000. ترجمة الدكتور أحمد عثمان - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

وحدات التكاثر البنيوية

توجد في جماعة التجديد الخلوية التقليدية علاقة واضحة بين فعالية الخلايا الجذعية وبين البنية النسيجية للنسيج المعني. تتوضع الخلايا الانقسامية في مكان ما، بينما تتوضع الخلايا المتمايزة في مكان آخر. على سبيل المثال، في الخبايا المعوية crypt، توجد الخلايا الجذعية قرب قاعدة الخبية بينما تشغر خلايا المكاثرة الانتقالية نحو ثلثي ارتفاع الخبية، وتتوضع الخلايا المتمايزة بعد الانقسامية في الجزء العلوي من الخبية والزغيبات [2]. وتتألف البنية السيجية لمعظم الظهارات وبشكل واضح من وحدات بنيوية (على سبيل المثال: غدد المعدة، عنبات الغدد اللعابية، الفصيصات الكبدية، ونفرونات الكلية). وعلى الرغم من الغياب الكبير للدليل الجيد، فإنه من المثير النظر إلى هذه البنى كوحدات تجديد خلوي، وبكلمة أخرى، اعتبار كل وحدة نسيجية مرئية "كوحدة تكاثر بنيوية" مؤلفة من خلية أو بضع خلايا جذعية تمول حجيرة تكاثرية (الشكل 1) [9].

تأتي البراهين على هذا المفهوم من دراسات في الترتيب النسيلي للظهارات، وإن أفضل حالة محلّلة في هذا المجال هي دراسة في المعي الدقيق. وقد اتبع نمطان رئيسان للدراسة. حيث استخدمت في نمط الدراسة الأول خيميرات تجميعية فأرية، شُكّلت من ضمّ جنينين معاً في مرحلة ما قبل التعشيش. تمتزج خلايا الجنينين جيداً وتتعاون لتشكيل فأر واحد بحجم طبيعي وتناسب تشريحي طبيعي. وإذا اختلف الجنينان في تعبيرية بعض الواسمات المورثية، فمن الممكن عندها كشف الترتيب النسيلي للنسج. تكون الخبيات المعوية متعددة النسيلة عند تشكلها الجنيني وتصبح وحيدة النسيلة بعد أسبوع إلى أسبوعين من الولادة [15-17]. وهذا لايعني، كما اقترح في البدء، أن هناك خلية جذعية واحدة فقط في كل خبية، لأنه من المحتمل أن يتناقص التنوع المورثي للخلايا الجذعية تدريجياً بسبب كل من انقسام الخبية [18] وتمايز كل ذُرّية لخلية جذعية [19]. ويُستخدم في الطريقة الثانية التطفير لإنتاج واسم خلوي مرئي. أظهرت التجارب الأولى مرة ثانية وجود خبيات طافرة وحيدة النسيلة [20-22] وقد أعيقت هذه التجارب بسبب مشاكل الكشف النسيلي. ويقترح عمل



الشكل 1- وحدات مكاثرة بنيوية. في نموذج التعضي النسيجي هذا، تستقر كل بنية غدية بواسطة عملية استبدال خلوي بطيئة. هناك "عش" تتحدد حدوده بتأثرات مع النسيج السدوي، ويحافظ على خلية أو بضع منها كخلايا جذعية. ستتحرك ذُرّية الخلايا الجذعية حول الغدة بحيث تحذف الخلايا الأقدم بعملية موت خلوي مبرمج (انتحار خلوي) apoptosis في الطرف المقابل.

حديث يستخدم واسماً إيجابياً في النسيلة الطافرة وجود أربع إلى خمس خلايا جذعية في كل خبية [23].

وليس من الواضح حالياً مدى تعضّي وانتظام الظهارات الأخرى كوحدات مكاثرة بنيوية لأن الانحراف نحو حالة أحادية النسيلة سيكون بطيئاً حيث يكون الاستبدال الخلوي بطيئاً [24]. وتتّبع الغدد المعدية حقاً القاعدة [25]، وهناك بعض التضارب في المعلومات فيما يخص الكبد [26، 27]، أما في بشرة الجلد، وفي جراب الشعرة فمن المحتمل وجود وحدات مكاثرة بنيوية ذاتية الاحتواء ولكن ليست المناطق الرئيسة من البشرة الجلدية الموجودة بين جرابات الشعر مجزأة إلى بنى واضحة [28، 29].

تعددية وأحادية المقدرة الكامنة

تتألف الظهارات عادة من عدة أنماط خلوية متمايزة، وغالباً ماتعد المقدرة على تشكيل هذه الأنماط جميعها، أو مايدعى "تعددية المقدرة الكامنة"، مظهراً من مظاهر سلوكية الخلايا الجذعية. وإن البراهين على وجود هذه المقدرة الكامنة المتعددة قوية رغم نشوئها من حالات الأضرار النسيجية الحادة. على سبيل المثال، توجد في المعي الدقيق أربعة صفوف من الخلايا المتمايزة الناضجة (خلية امتصاصية، كأسية goblet، عالية paneth، وخلية معوية ذات إفراز داخلي entero endocrine). لقد اقترح مفهوم الخلية الجذعية متعددة المقدرة الكامنة القادرة على إنتاج جميع الأنماط الخلوية الأربعة من قبل شنغ وليبلاند [30]، اللذين تتبعا حسيمات بلعمية موسومة إشعاعياً من مركب thymidine [^{3}H] وذلك من خلايا قاعدة الخبية حتى الجماعات الخلوية المتمايزة. وعلى الرغم من تحديد منطقة الخلية الجذعية، إلا أن هذا العمل لم يبرهن على وجود خلايا متعددة المقدرة الكامنة. ولقد تمّ تقصي وجود خلايا ثنائية المقدرة الكامنة (امتصاصية وكأسية) حديثاً عن طريق التطفير mutagenesis [23]. وقد أتت براهين على وجود خلايا متعددة المقدرة الكامنة باستعمال جرعات تشعيعية كافية لتحطيم معظم الخلايا، وأُتبع ذلك بعملية تجديد خلوي من بؤر معزولة. ولقد برهن على أن هذه كانت وحيدة النسيلة لأنها تتألف فقط من نمط وراثي واحد عندما فُحصت من أجل واسمات مورثية مرتبطة بالصبغي X-linked عند الإناث متخالفات اللواقح heterozygous [31]. وتستطيع كل بؤرة وحيدة النسيلة إنتاج ثلاثة من الأنماط الخلوية الأربعة على الأقل، رغم أن الحيوانات لم تعش لفترة كافية من أجل إنتاج الخلايا العالية. وعلى الرغم من كون هذه النتيجة لايكتنفها الغموض، إلا أن درجة الأذية النسيجية الناجمة عن التشعيع كبيرة جدًّا، وبذلك فإنها قد لاتعكس حالة الاستبدال الخلوي الطبيعية.

يُفترض أن تشبه الخلايا الجذعية متعددة المقدرة الكامنة البقايا الجنينية الأصلية في النسيج المعني، والتي ستنتج خليط الأنماط الخلوية الملائمة خلال مسيرة التطور الجنيني الطبيعي. فعلى سبيل المثال، تشكل البشرة الجلدية الجنينية كلاً من البشرة المطبقة وجريبات الشعر [32]، وتُشكل الخلايا الأرومية الكبدية الجنينية كلاً من الخلايا الكبدية وخلايا القنوات

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

الصفراوية [33، 34]، وتُشكّل الظهارة البنكرياسية الجنينية كلاً من أنماط الخلية الغدية الداخلية الإفراز والخارجية الإفراز [35].

وعلى الرغم من عدم الشك في وجود بعض الخلايا القادرة على إظهار سلوكية متعددة المقدرة الكامنة تبعاً لأذية نسيجية، إلا أن هناك دليلاً أيضاً، فعندما تكون الأذية ضعيفة أو غير موجودة، فإن معظم الخلايا الجذعية وحيدة المقدرة الكامنة، تنتج نمطاً واحداً من الخلايا المتمايزة. وأفترض هنا أن تعريف "خلية جذعية" يمكن أن يشمل خلايا أحادية المقدرة الكامنة إضافة إلى خلايا متعددة المقدرة الكامنة. فعلى سبيل المثال، في الكبد، يبدأ التجديد في المرحلة الطبيعية بعد الولادة بدءاً من خلايا كبدية [36]، ولكن إذا ثبط انقسام الخلايا الكبدية فإن التجديد يمكن أن يحدث بدءاً من خلايا قُنيوية بيضوية الشكل بدلاً من الخلايا الكبدية [4]. وفي البنكرياس، ربما يعود الاستبدال الخلوي الطبيعي البطيء خلال حياة الفرد البالغ إلى النمو الداخلي المنشأ لحجرة الخلايا الداخلية الإفراز والخارجية الإفراز بصورة منفصلة [6]. لكن وفي ظروف غير طبيعية، كحالة الفئران المحوّرة وراثياً ذات التعبيرية المورثية لمركب interferon-3 في البنكرياس، يمكن أن يحدث هنا تشكيل جديد de novo من القنيات لجزيرات إفرازية وعنبات acini إفراز خارجي [37، 38]. وأخيراً، تقترح دراسات التطفير الحديثة في الأمعاء الدقيقة أن 80 إلى 90% من النسائل الطافرة طويلة العمر وحيدة المقدرة الكامنة، وتشكل إما خلايا امتصاصية أو خلايا كأسية، بينما يكون 10 إلى 20% منها فقط متعدد المقدرة الكامنة [23].

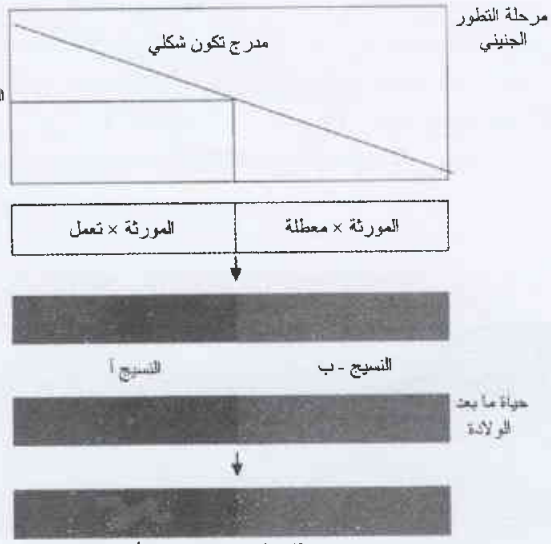
تقترح جميع هذه الأمثلة حصول حالة تجديد خلوي مستقرة لدرجة كبيرة من الخلايا الجذعية وحيدة المقدرة الكامنة، بينما يمكن أن يحدث تجديد للأنسجة بعد حصول أذية فيها من قبل خلايا جذعية متعددة المقدرة الكامنة. ويقترح ذلك، عندما يكون التجديد مطلوباً، وجوب وجود شارات كيميائية بؤرية تتحرر ضمن الأنسجة، والتي يمكن أن تفعّل الخلايا متعددة المقدرة الكامنة الهاجعة، وإن لتحديد هذه الشارات أهمية سريرية بالغة، ولكننا لانعلم سوى القليل عن هذه الشارات في الوقت الحاضر. وتبيَّن بصورة مثيرة، أن التعبيرية الفائقة المفرطة لنسخة ثابتة من B-Catenin ضمن البشرة الجلدية تسبب التشكيل الجديد لجريبات شعرية [39]، وهذا دليل إضافي على تورط الطريق الحيوي لـ Wnt في ضبط سلوكية الخلايا الجذعية.

التحوّل النسيجي

تستمر خلية جذعية طيلة الوقت، أكانت وحيدة المقدرة الكامنة أم متعددة المقدرة الكامنة، في توليد الأنماط الخلوية المميزة لنسيجها الذي تنتمي إليه. ويمكن أن تحدث أخطاء عرضياً تقود إلى حدوث التحوّل النسيجي، ومرة أخرى نذكر أن ذلك يمكن أن يتم دائماً وبشكل تقريبي بارتباط مع حدوث أذية نسيجية أو تجديد نسيجي. يعني التحوّل النسيجي تشكيل نمط خلوي متمايز من نمط خلوي آخر أثناء الحياة بعد الولادية، ويحدث ذلك لأن واحدة من الخلايا الجذعية أو بضعاً منها يُغير حالة التحديد التطوّري الخاص بها. وفي الجنين، تملك النُّسج التي تتطور مثل البداءات المجاورة لها في غمد خلوي مشترك تشكيلات متشابهة من عوامل الاستنساخ transcription factors التي تُحدِّد ارتباطاتها ويمكن أن تختلف بتعبيرية عامل واحد فقط من عوامل الاستنساخ المورثي. وبافتراض أن خلايا جذعية هي واقعياً وفعلياً على نفس حال أسلافها الجنينية الأصلية وذلك من أجل نسيج ما، فإن تبدلاً في حالة مورثة ما فيما بعد أي أثناء مسيرة الحياة سيسبب "تهرب flip" الخلايا الجذعية هذه من إنتاج نسيج إلى إنتاج نسيج آخر (الشكل 2).

ليست ظاهرة التحوّل غريبة في الظهارات وغالباً مايتضمن انقلاباً لبقعة من النسج إلى نمط آخر ينشأ كبداءة مجاورة في الجنين [40]. على سبيل المثال، تصادف بقع من الظهارة المعوية الهاجرة ectopic في المعدة [41]، وتصادف ظهارة من نمط كولوني (المعي الغليظ) في المثانة البولية [42]، وتصادف ظهارة نمط بطانة عنق الرحم ضمن المهبل [43]، أو تصادف بؤر من الخلايا الكبدية ضمن بنكرياس آخذ في التجديد [44].

ومن المثير تقصّي نشوء الحالات الانتقالية هذه إما من طفرة جسمية للمورثات الرامزة لتحديد الخلايا الجذعية أو من عملية فوق مورثية epigenetic تقوم بتفعيل أو كبح هذه المورثات نفسها. تعمل إحدى المقاربات المتعلقة بهذا الموضوع، وتبعاً لأبحاث سرطانية، على تقصي فيما إذا كانت البؤر الانتقالية وحيدة النسيلة. ويمكن إجراء ذلك بفحص تكوينها النسيلي في حيوانات موزاييكية (فسيفسائية) مؤلفة من خليط من خلايا من أنماط مورثية مختلفة. وقد وضّحت دراسة حديثة لانتقالية معوية أن البؤر كانت عديدة النسيلة ويجب طبقاً لذلك أن تنشأ من أكثر من خلية واحدة [46]. وبذلك يستبعد أن تكون الآلية العاملة لتبدل فوق مورثي. وهناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لبؤر انتقالية من أنماط أخرى لمعرفة فيما إذا كان ذلك قاعدة عامة.



الشكل 2- اللدونة الانتقالية. ينشأ عند الجنين نمطان نسيجيان من غمد خلوي مشترك لأن المورثة X قد فعلت في أحد النسيجين ولم تفعل في النسيج الآخر. وإذا ماحدث لاحقاً شيء ما وعطّل هذه المورثة في خلية جذعية أو بضع منها ضمن هذا النسيج، فإن ذلك يؤدي إلى حدوث لدونة انتقالية.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

اللدونة الأوسع انتشاراً للخلايا الجذعية؟

إن وجود اللدونة الانتقالية في الظهارات هو دليل على وجود شيء من اللدونة plasticity في الخلايا الجذعية. وقد اقترح نمط أكثر حسماً من إعادة البرمجة من بعض التجارب الحديثة في عمليات تطعيم خلايا نقي العظم بين الأفراد. ولقد توضَّح حديثاً أن نقي عظم موسوم وراثياً يستطيع المساهمة في تجديد عضلة هيكلية [47] وفي تجديد الكبد [48] في الحيوانات المضيفة. وفي إحدى الدراسات، كان الطعم يتكون من خلايا جذعية مكونة للدم [49]. وعلى الرغم من قلة تواتر البؤر الموسومة وطول المدة اللازمة لتطورها، إلا أن هذه النتيجة تبقى مميزة لأن ذلك يتطلب إعادة برمجة قصوى للتحديد التطوري لفترة أطول من ذلك الملاحظ في اللدونة الانتقالية الداخلية المنشأ. وتتضمن التجارب حقن معلق من الخلايا، وبذلك يُرجَّح أن تنتهي الطعوم مفردة الخلايا بإحاطة كاملة بخلايا من نسيج غريب. وفي التجارب الجنينية، تظهر الخلايا المفردة المعزولة غالباً مطواعية lability تطورية أكبر من تلك الملاحظة في الكتل النسيجية المنتشرة [50، 51]. ويمكن بالتالي توقع مثل ذلك عند الحيوان الناضج.

يجب أن لاتشوش نتائج مثل هذه التجارب أفكارنا في حال اقترحنا أن جميع الأنماط الخلوية متشابهة. إن خلية جذعية مولدة للدم وواضحة التمييز مختلفة وبصورة جلية عن خلية جذعية جنينية مكافئة لها مدروسة جيداً وربما مختلفة عن الخلايا الجذعية الظهارية لأنماط النسج المتمايزة المتنوعة. ولكن الدراسات وضَّحت بالتأكيد وجود طيف فعَّال ومعتبر لإعادة برمجة خلايا جذعية ظهارية بوجود تبدلات في الوسط المحيط بها. ويقترح وجود عمليات داخلية المنشأ من الترميم والإصلاح النسيجي في العديد أو في معظم الظهارات أن هناك مجالاً كبيراً غير مكتشف من العلاجات الجديدة الفعَّالة مبنياً على حث الآليات الترميمية هذه. ويتطلب التقدم في هذا المجال تمييزاً أفضل للخلايا الجذعية الظهارية على صعيد الواسمات الجزيئية. ويتطلب الأمر أيضاً بناء نظم استنبات في الزجاج أكثر تطوراً، مثل تلك المستخدمة للبشرة الجلدية [3، 52]، حيث يمكن بحث كيفية التحكم بسلوكية الخلايا الجذعية بالتفصيل. ربما يكون التقدم الأهم في تحديد عوامل الوسط المحيط الغامضة التي تتحكم في سلوكية خلية جذعية، وذلك بالتضافر مع المقدرة الكامنة للتجديد الذاتي واستطاعة تشكيل أنماط خاصة من الخلايا المتمايزة.

المراجع REFERENCES

[1] B. Alberts et al., Eds., in The Molecular Biology of the Cell (Garland, New York, 1994), pp. 1138-1193.

[2] C. S. Potten and M. Loeffler, Development 110, 1001,(1990).

[3]. F. M. Watt, Philos Trans. R. Soc. London Ser. B 353, 831 (1998).

[4] M. Alison et ai., J. Hepatol. 26, 343 (1997).

[5] J. M. W. Slack, Development 121, 1569 (1995).

[6] D. T. Finegood, L Scaglia, S. Sonner-Weir, Diabetes 44, 249 (1995).

[7] L. G. Lathja, in Stem Cells, C. S. Potten, Ed. (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983), pp. 1-11.

[8] L. Wolpert, Principles of Development (Oxford Univ. Press, Oxford, 1998).

[9] C. S. Potten, in Stem and Tissue Homeostasis, B. I. Lord, C. S. Potten, R. J. Cole, Eds. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1978), pp. 317-334.

[10] P. H. Jones and F. Watt, Cell 73, 713 (1993).

[11] A. Li, P. J. Simmons, P. Kaur, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 3902 (1998).

[12] A. J. Zhu and F. M. Watt, Development 126, 2285(1999)

[13] S. Lyle et al., J. Cell Sci. 111, 3179 (1998).

[14] V. Korinek et al., Nature Genet. 19, 379 (1998).

[15] G. H. Schmidt, D. J. Winton, B. A. J. Ponder, Development 103, 785 (1988).

[16] K. A. Rath, M. L Hermiston, J. I. Cordon, Proc. Narl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9407 (1991).

[17] M. L. Hermiston and J. I. Cordon, Am. J. Physiol. 268, G813 (1995).

[18] H. Cheng and M. Bjerknes, Anat. Rec. 211, 420 (1985).

[19] M. Loeffler, A. Birke, D. Winton, C. S. Pocten, J. Theor. Biol. 160, 471 (1993).

[20] D. F. R. Griffiths, S. J. Davies, D. Williams, G. T. Williams, E. D. Williams, Nature 333, 461 (1988).

[21] D. J. Winton, M. A. Blount, B. A. J. Ponder, Nature 333, 463 (1988).

[22] J. I. Gordon, G. H. Schmidt, K. A. Roth, FASEB J. 6, 3039 (1992).

[23] M. Bjerknes and H. Cheng Gastroenterology 116, 7 (1999).

[24] M. Kusakabe et al., J Cell Biol. 107, 257 (1988).

[25] S. Nomura, H. Esumi, C. job, S. S. Tan, Dev. Biol. 204, 124 (1998).

[26] S. H. Sigal. S. Brill, A. S. Fiorino, L. M. Reid, Am. J. Physiol. 263, G139 (1992).

[27] M. Alison, M. Golding, E. N. Lalani, C. Sarraf, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 353, 377 (1998).

[28] G. H. Schmidt, M. A. Btount, B. A. J. Ponder. Development 100, 535 (1987).

[29] U. B. Jensen, S. Lowell, F. M. Watt, Development 126, 2409 (1999).

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

[30] H. Cheng and C. P. Leblond, Am. J. Anat. 141, 537 (1974).

[31] M. Inoue et al., Am. J. Pathol. 132, 49 (1988).

[32] P. Sengel, The Morphogenesis of Skin (Cambridge Univ, Press, Cambridge, 1976).

[33] N. Shiojiri, J. M. Lemire, N. Fausto, Cancer Res. 51, 2611 (1991).

[34] S. S. Thorgeirsson, Am. J. Pathol. 142, 1331 (1993).

[35] A. C. Percival and J. M. W. Slack, Exp. Cell Res. 247, 123 (1999).

[36] G. K. Michalopoulos and M. C. DeFrances, Science 276, 60 (1997).

[37] L. Rosenberg, R. A. Brown, W. P. Duguid, J. Surg. Res. 35, 63 (1983).

[38] D. Gu and N. Sarvetnick, Development 118, 33 (1993).

[39] U. Gat, R. DasGupta, L. Degenstein, E. Fuchs, Cell 95, 605 (1998).

[40] J. M. W. Stack, J. Theor. Biol. 114, 463 (1985).

[41] N. Matsukura et al., J. Natl. Cancer Inst. 65, 231 (1980).

[42] A. M. Ward, Virchows Arch. Abt. A Pathol. Anat. 352, 296 (1971).

[43] D. A. Antonioli and L. Burke, Am. J. Clin. Pathol 64, 625 (1975).

[44] M. S. Rao et al., Am. J. Pathol. 134, 1069 (1989).

[45] J. S. Wainscoat and M. F. Fey, Cancer Res. 50, 1355 (1990).

[46] S. Nomura, M. Kaminishi, K. Sugiyama, T. Oohara, H. Esumi, Gut 42, 663 (1998).

[47] G. Ferrari et at., Science 279, 1528 (1998).

[48] B. E. Petersen et al., Science 284, 1168 (1999).

[49] E. Gussoni et al., Nature 401, 390 (1999).

[50] D. Forman and J. M. W. Slack, Nature 286, 492 (1980).

[51] J. B. Gurdon, Nature 336, 772 (1988).

[52] R. H. Whitehead, K. Demmler, S. P. Rockman, N. K. Watson, Gastroenterology 117, 858 (1999).

[53] I thank D. Tosh and F. Watt for comments on drafts. This work was supported by the Medical Research Council, grant G9520375■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

الخلايا الجذعية التي تصنع الجذوع*

د. رايجل
مختبر بيولوجيا النبات، معهد سالك للدراسات البيولوجية
كاليفورنيا - الولايات المتحدة.
وقسم البيولوجيا الجزيئية، معهد ماكس بلانك للبيولوجيا المتطورة، توبنجن-ألمانيا.
ج. جورجنز
مركز بيولوجيا النباتات الجزيئية، جامعة توبنجن- ألمانيا.

ملخص

توجد الخلايا الجذعية النباتية ضمن بنى متخصصة تدعى المرستيمات Meristems تتميز بقدرات تجدد مذهلة. وهي تمكن النباتات من النمو ومن إنتاج أعضاء جديدة خلال فترات حياتها التي قد تمتد لمئات السنين.

الكلمات المفتاحية: خلايا جذعية، مرستيم، المركز الساكن، المحيط الدائر، الأرابيدوبسيس.

قليلة هي الحيوانات التي تبلغ عامها المئة. ورغم أن النباتات لم تكتشف بعد سر الخلود، إلا أن الكثير من الأشجار يعيش مئات السنين وبعضها - كالصنوبريات شوكية المخاريط bristlecone pines التي تنمو في الجبال الغربية لأمريكا الشمالية - تعمر عدة آلاف من السنين. وتستطيع النباتات بلوغ فترات حياة مذهلة كهذه لأن تصميم جسمها نمطي يتميز بتشكيل مستمر ومتكرر لبنى وأعضاء جديدة مثل الأوراق والأزهار تمكّن النباتات من تحمل ضرر واقعي.

وشرط مسبق لتعمير النبات هو مقدرته في الحفاظ على مجموعات من الخلايا غير المتخصصة وغير الناضجة ضمن النبات البالغ لفترات طويلة من الزمن. ومجموعات الخلايا هذه هي "الخلايا الجذعية Stem Cells" القادرة على تجديد نفسها وعلى توليد كثير من أنماط الخلايا المتخصصة والناضجة. وبغض النظر عن الالتباس الناجم عن تسميتها باللغة الإنكليزية، تكون الخلايا الجذعية النباتية باعثاً على تشكل ما هو أكثر كثيراً من السوق حيث إنها الخلايا التي تشتق منها جميع الأنسجة النباتية.

وعموماً، تكاد الخلايا الجذعية أن لا تحتاج أي تعريف لأن هذه التسمية أصبحت واسعة الانتشار حتى في الصحف وسبب ذلك طبعاً هو التنوع المؤكد للخلايا الجذعية الخاصة بالثدييات والنجاح الأخير في عزلها من البشر مما زاد احتمال استخدامها لمعالجة عديد من أمراض الإنسان [1].

توصف الخلايا الجذعية التي يمكن أن تنتج طيفاً شاملاً لأنماط خلايا الكائن الحي بأنها كلّية المقدرة الكامنة totipotent (من اللاتينية totus = شامل) وفي معظم الحيوانات، تكون البيضة الملقحة (أو الزيجوت) ونسلها المباشر الخلايا الوحيدة التي توصف بأنها كلّية المقدرة الكامنة. والخلايا الجذعية في حيوان ثديي بالغ، كتلك التي تولّد خلايا الدم بشكل مستمر، تكون سبباً في توليد طيف محدّد من أنماط الخلايا البالغة وتعتبر خلايا جذعية متعددة المقدرة الكامنة Pluripotent (من اللاتينية Pluris = كثير أو متعدد). وعلى نقيض ذلك، فإن عديداً من الخلايا النباتية تستمر بكونها كلّية المقدرة خلال كامل حياة النبات - حيث يمكن إكثار النباتات من قطع صغيرة من أنسجتها وحتى من خلايا إفرادية.

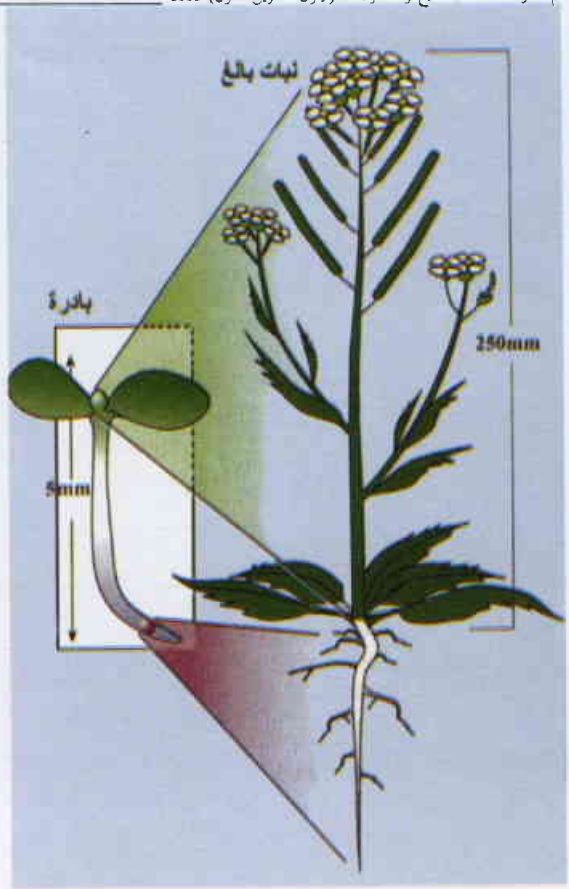
لقد كانت ضئيلة معرفتنا بالجزيئات التي تحكم مصير الخلايا الجذعية للنبات أو تنظمها ضمن المرستيمات، وهي البنى المتخصصة الموجودة عند قمم الفوارع والجذور؛ لكن ذلك آخذ بالتبدل حالياً. ونتج معظم التقدم في فهم وظيفة المرستيمات والخلايا الجذعية النباتية من دراسات أجريت على نبات الأرابيدوبسيس Arabidopsis thaliana وهو نبتة ضارة صغيرة شائعة الاستعمال في الأبحاث ويُعدّ النبات الأول الذي تم بشكل كامل تسلسل الجينوم الخاص به؛ كما أن كثيراً من أسس تنظيم الخلايا الجذعية التي تمّ توضيحها في هذا النبات يحتمل أن تنطبق على نباتات أخرى، ومثالها طفرات المورثات المقابلة في نبات حنك السبع (Antirrhinum) أو الذرة Zea mays والتي تسبب عيوباً مماثلة. نحن نركز هنا على الملامح الأكثر بروزاً لتطوير المرستيم وتنظيمه [2] ولمناقشة كيف تحافظ التأثرات بين الأنواع المختلفة لخلايا المرستيم على قيامه بوظيفته على نحو ثلائم.

المنشأ الجنيني للمرستيمات

تبدأ بادرة النبات نموذجياً بمرستيمين - يتوضعان على قمتي الجذر والفارع على التوالي. هذان هما المرستيمان الأوليان اللذان ينتجان معظم النبات البالغ (الشكل1)، وينتج المرستيم الجذري الأولي جميع أنسجة الجذر الرئيسة وينتج المرستيم الفارعي الابتدائي جميع أنسجة الساق الرئيسية للنبات بما تحمله من أوراق، وينشأ عن هذا المرستيم ما يسمى المرستيم الثانوي الذي ينتج الفوارع الجانبية والأزهار.

* نُشِر هذا المقال في مجلة *Nature*, Vol.415, 14 February 2002. ترجمة الدكتور نجم الدين الشرابي - هيئة الطاقة الذرية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



الشكل 1– دور مرستيمي الجذر والفارع في نبات Arabidopsis. يحوي المرستيم الفارعي على حوالي 100 خلية ذات أقطار أقل من 100 ميكرومتر؛ ولمرستيم الجذر حجم مشابه (أعمدة سلم تقريبية موضحه للمقارنة).

يتشكل المرستيمان الأوليان كلاهما في مرحلة مبكرة من التطور الجنيني كما هو موضح في المؤطر1 على الصفحة التالية. ولنشأة المرستيم الجذري تفرد خلية واحدة لتصبح نخامة أو طليعة ما يطلق عليها اسم المركز الساكن quiescent center الذي ينظم المرستيم. يبدو أن تأسيس المركز الساكن بحد ذاته يعتمد على اتصال بين خلية وأخرى يتوسطه الهرمون النباتي (أوكسين auxin)، وهذا عبارة عن مركّب صغير مرتبط كيميائياً بالحمض الأميني تريبتوفان. وقد تمّ استنتاج تورط الأوكسين من ملاحظة أن الأجنة التي تفتقر إلى عامل الاستجابة للأوكسين MONOPTEROS (MP) تفشل في فرز ونشوء النخامى ولا يتطور النسيج الجذري [3].

من المحتمل أن تُحدِّد عملية محرَّضة مشابهة، تشمل اتصال- خلية – بخلية، المرستيم الفارعي. ويُعدّ تعريف الواسمات الجزيئية molecular markers أحد الإنجازات الحديثة في فهم التطور المرستيمي وهذه عبارة عن مورثات محددة (والبروتينات التي تكوّدها) مميزة لبنية الخلية أو الطور المدروس. وأول الواسمات الجزيئية المعرفة للمرستيم الفارعي هو المورثة WUSCHEL (WUS) والتي تُشغّل أولياً في أربع خلايا داخلية للجنين خلال طور الـ 16 – خلية (انظر المؤطر 1). وحينما تنقسم هذه الخلايا فإن تلك الخلايا الملاصقة لطليعات الأنظمة الوعائية الجنينية فقط تحفظ التعبير عن WUS، مما يقترح أن إشارة من الخلايا الطليعية الوعائية ستكون مطلوبة للحفاظ على تعبير WUS.

التنظيم المرستيمي

تنحصر الخلايا الجذعية في مراكز مرستيمات الجذر والفارع. وهي تنقسم ببطء وينشأ عنها نمطان من الخلايا البنات. تحافظ الخلاياالتي تبقى في المركز على كونها خلايا جذعية بينما تدخل الخلايا البنات التي تدفع إلى المحيط الخارجي للمرستيم في مسار تنام يقودها كي تتمايز وتتحول إلى خلايا جذرية أو طرفية نوعية أو إلى أعضاء نوعية مثل الأوراق، أو إلى بدء ظهور مرستيمات ثانوية [4،7]. وحيث أن المرستيم يعمل لفترة طويلة من الزمن فإن التوازن بين تكاثر الخلايا الجذعية والتمايز يجب أن يكون رائع الدقة. وعلى سبيل المثال، فإن انقساماً إضافياً واحداً مرة في السنة سيجعل المرستيم أكبر 1000 مرة من حجمه الطبيعي بعد مرور عشر سنوات فقط، وهذا زمن قصير في حياة شجرة ما.

يجري الحفاظ على الخلايا الجذعية وتكاثرها عن طريق إشارات تستقبلها هذه الخلايا من البيئة الموضعية. وفي لب حفظ التنظيم والوظيفة للمرستيم الفارعي حلقة تغذية راجعة Feed back loop سالبة ذات عنصرين حرجين هما المورثتان (WUS) و CLAVATA3 (CLV3)؛ الأول WUS يكوّد عامل نسخ transcription، وهو بروتين ينظم مباشرة مورثات أخرى، ويُعبَّر عنه ضمن (مجموعة من الخلايا) المركزية تعرف بمركز التنظيم وهي تقع مباشرة أسفل الطبقة القمية للخلايا الجذعية الفعالة [8] (انظر المؤطر 1). وعبر آلية غير معروفة فإن WUS يوجه الخلايا المجاورة لتكون خلايا جذعية والتي بدورها تتميز بالتعبير عن CLV3. وبروتين CLV3 المفرز بدوره يتآثر مع المعقد المستقبل الأوسع تعبيراً CLV1/CLV2 ليحدد مساحة التعبير عن WUS في المركز المنظم التحتي [9–12].

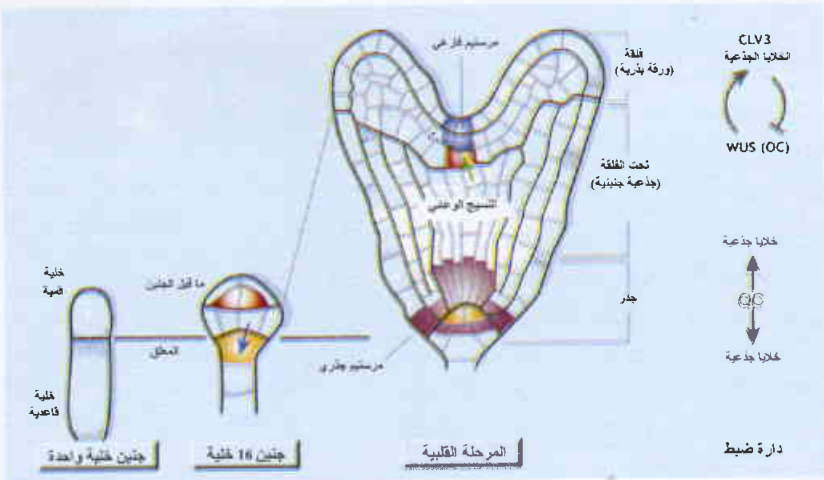
تصحح حلقة التغذية الراجعة السلبية هذه بأناقة الشذوذات العابرة في عدد الخلايا الجذعية والتي تؤدي زيادة أعدادها إلى فائض في CLV3 والذي يسبب بدوره خفضاً في التعبير عن WUS وبالتالي إلى إشارة منخفضة لتكاثر الخلايا الجذعية. إذا كان هناك من ناحية أخرى عدد قليل جداً من الخلايا الجذعية، فإن النقص في CLV3 يؤدي إلى زيادة WUS والذي يزيد بدوره أعداد الخلايا الجذعية. وتتضح أهمية حلقة التغذية الراجعة حين يتم تخريبها بصورة دائمة. على سبيل المثال، إذا عطلت المورثة WUS أو جعل التعبير عن CLV3 مستقلاً عن WUS يتراجع حجم المرستيم (يتوقف نموه). وعلى العكس إذا تمّ تعطيل المورّثة CLV3 أو جُعل التعبير عن WUS مستقلاً عن حلقة التغذية الراجعة السلبية فإن المرستيم يتضخم بصورة مثيرة.

وعلى الرغم من عدم معرفتنا بوجود دورة تنظيمية مشابهة تتحكم في وظيفة مرستيم الجذور فإن تنظيمه مشابه لذلك الخاص بالمرستيم الفارعي مع وجود مركز تنظيمي من خلايا لا تنقسم (المركز الساكن) والذي يكون ضرورياً للمحافظة على مصير جذعية الخلايا لتلك الخلايا الملاصقة لها مباشرة (انظر المؤطر 1). وكما هو الحال في الفارع يكون اتصال خلية – خلية ضرورياً: إذا قتلت خلية المركز الساكن (باستعمال حزمة ليزرية دقيقة التسديد) فإن الخلايا الملاصقة تتمايز عوضاً عنها [13].

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

المؤطر 1:

المنشأ الجنيني للمرستيمات الأولية



يتطاول زيجوت نبات Arabidopsis الوحيد الخلية (غير مبينة) في اتجاه يحدد توجه القمة والقاعدة المستقبلي للجنين، وينتج عن الانقسام الأفقي الجنين وحيد الخلية. وتنتج الخلية الطرفية معظم الجنين وتنتج الخلية القاعدية المعلق الحيطي بطول ست إلى ثماني خلايا وهو يربط الجنين بالنسيج الأم. تنتج سلسلة من الانقسامات المجسمة النمط طور الخلايا 16 ما قبل الجنين (يظهر منها 8 خلايا فقط). يظن بان إشارة صادرة عن الجنين (السهم الأزرق الفاتح) هي التي تعيّن مصير النخامى (برتقالي) والتي هي الخلايا العلوية القصوى للمعلق الذي ينشأ عنه المركز التنظيمي الساكن لمرستيم الجذر. وأول واسم للمرستيم الفارعي المعبر عنه هو WUS (أحمر) والذي يمكن ملاحظته في طور الـ 16 خلية ما قبل الجنين والتعبير عنه مثبت في مركز الجنين، بحيث تعطي الانقسامات غير المتناظرة خلايا WUS موجبه وWUS سالبة. وكما يلاحظ في الطور القلبي فإن خلايا WUS الموجبة للمرستيم الفارعي بقيت مجاورة لطلائع النظام الوعائي، وهذا يقترح أن يكون التعبير عن WUS أما محرضاً و/ أو محافظاً عليه بوساطة إشارة من هذه الخلايا (السهم الأخضر) وتقع الخلايا الجذعية للمرستيم الفارعي فوقها مباشرة (أزرق غامق).

فور إنتاج الطور القلبي الجنيني المؤلف من حوالي 250 خلية يحدث تشكل لكامل المخطط الأساسي للجنين. ويتألف النمط القمي القاعدي في محاذاة المحور الرئيسي من المرستيم الفارعي وعلى جانبيه المنطقتان اللتان ستعطيان الفلقتين Cotytedons أو الأوراق البذرية، والسويقة الجنينية hypocotyl، والجذر، والمرستيم الجذري.

يحافظ على مجموعات الخلايا الجذعية ضمن المرستيم بوساطة مراكز التنظيم المجاورة. أما في المرستيم الفارعي فتقوم عروة التغذية الراجعة السالبة WUS / CLV3 (انظر النص) بتنظيم مجموع الخلايا الجذعية. ويقوم WUS المعبر عن خلايا من مركز التنظيم (أحمر: OC) بالمحافظة على الخلايا المبطنة ككخلايا جذعية(أزرق غامق). وفي مرستيم الجذر تقوم الخلايا اللامنقسمة للمركز الساكن (برتقالي، QC) بالمحافظة على الخلايا المجاورة على صورة خلايا جذعية (أرجوانية).

من المرستيمات إلى الأعضاء

لا ينحصر مبرر وجود المرستيم بالمحافظة على نفسه، بل يمتد هذا المبرر إلى إنتاج أجزاء النبات المختلفة. يُنشىء المرستيم الأولي لكل من الفوارع والجذور بنى متطاولة هي السوق والجذور الأولية، وكلاهما يُزينان بأعضاء جانبية مثل البراعم والجذور الجانبية. وعلى الرغم من هذا التشابه السطحي فإن الطرق التي تنشأ بها الأعضاء الجانبية في الفوارع والجذور تختلف كلياً، فتنتج الأوراق نموذجياً من مرستيم الفارع الأولي مباشرة بينما تشتق الجذور الجانبية من مرستيمات الجذر الثانوي الذي ينشأ من جديد de movo من طبقة الأنسجة الداخلية للجذر النامي، كما سيناقش فيما بعد.

تدفع الخلايا البنات في المرستيم الفارعي إلى المحيط الخارجي للمرستيم وتدخل إلى "نطاق المقدرة Zone of Competence" حيث تتشكل أعضاء جديدة. والعضو الجديد مثل الورقة يبدأ من مجموعة من خلايا لا تزال غير متمايزة وتستجيب بتناسق لإشارة (لا تزال غير معروفة) لتشكل العضو الأولي الذي يسمى "بداءة Primordium". تنشأ بداءات في نبات Arabidopsis عن مجموعات (يصل عددها إلى حوالي 12) من الخلايا المنشئة للبداءة التي تقدمها طبقتا البشرة وتحت البشرة كلتاهما لمحيط المرستيم [14،15]. ويحدد عاملان موقع المنطقة التي تتشكل بها كل بداءة هما: المسافة أو البعد عن مركز المرستيم حيث تقع الخلايا الجذعية، والمسافة عن البداءات السابقة التكوين. والخلايا التي تقع بين البداءات تترك في النهاية نطاق المقدرة وتساهم في تشكيل الساق إلا أننا لا نفهم كلياً الإشارات التي تحدد مواقع البداءات رغم أنه يبدو بأن الأوكسينات هامة في هذا المجال [16،17].

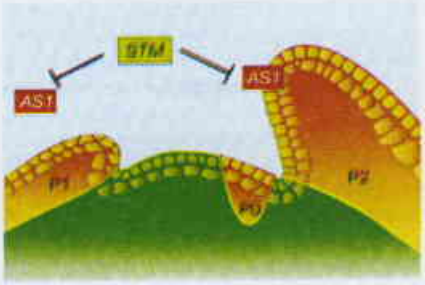
تميز عدة واسمات منطقة تكاثر المرستيم عن البداءات الأولية بما في ذلك مورثة SHOOT MERISTEMLESS (STM) التي تمنع الخلايا من الدخول في مسار التمايز وهي تقوم بذلك، على الأقل جزئياً، عن طريق كبح مورثة أخرى هي ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1) والتي يكون التعبير عنها محصوراً عادةً بالخلايا المؤسسة للبداءات [18] (الشكل 2). وفي الأنماط الطافرة التي تفتقر إلى STM، يمتد تعبير AS1 إلى المرستيم مسبباً توقفه. وعلى العكس فإن تعبير AS1 يكبح منظمات المرستيم الأخرى مثل المورثة ذات العلاقة بـ STM وهي KNAT1 في البداءة الناشئة. وفي الأنماط الطافرة التي تفتقر إلى AS1 فإن التعبير عن KNAT1 يستديم في بداءة الورقة مما ينتج أوراقاً لها صفات الفوارع [18،19]. وكما هو الحال في WUS فإن منظمات التمايز STM و AS1 وKNAT1 تكوّد عوامل النسخ.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

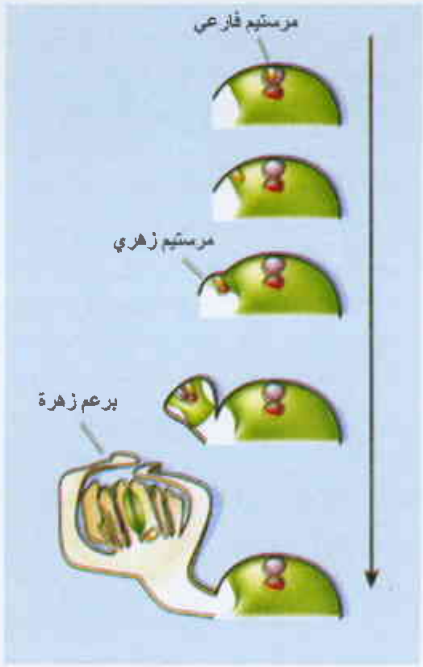
تتقاسم المرستيمات الأولية مع أنواع عدة من المرستيمات الثانوية العمل على إنتاج أنظمة الفوارع والجذور والتي غالباً ما تكون معقدة إلى حد بعيد والغاية في التعقيد في النبات الكامل. ويماثل تنظيم المرستيم الثانوي أساسياً ذلك الموجود في المرستيمات الأولية. هنالك مثالان للمرستيمات الثانوية في الجزء الهوائي للنباتات العشبية مثل نبات Arabidopsis هما: المرستيمات الفارعية الثانوية التي تتموضع عند نقطة اتصال الأوراق مع الساق، والمرستيمات الزهرية التي تنتج الأزهار. وعلى الأقل تُنتج المرستيمات الزهرية مباشرة من المرستيم الفارعي الأولي [20] (الشكل 3). ورغم أن المرستيمات الزهرية والفارعية متجاورة أو متلامسة فإن التعبير عن منظمات الخلايا الجذعية مثل CLV3 وWUS في مركز المرستيمات ليس كذلك، وبالتالي لابد من إعادة ترسيخ التعبير عنها من جديد في المرستيم الزهري [9،8]. وتبعاً لذلك يجب أن يمتلك النبات عملية لإعادة تنظيم ذاته تولد المرستيم الثانوي - وهي عملية تشابه نشوء المرستيمات الأولية خلال تطور الجنين.

الاختلاف الأساسي بين المرستيمات الزهرية والبرعمية، سواء، الأولية أو الثانوية، هو أن الأزهار تتشكل نموذجياً من عدد ثابت من الأجزاء (في حال نبات Arabidopsis أربع سبلات وأربع بتلات وست أسدية وكربلتان) بينما يمكن للمرستيم الفارعي أن يولد عدداً غير محدد من الأوراق. تنعكس الوظيفة المحددة للمرستيم الزهري بنمط مختلف للتعبير عن WUS والذي يجري الحفاظ عليه مؤقتاً في الأوراق، بينما يستمر لأجل غير محدد في المرستيم الفارعي. إذا لم يغلق WUS في الأزهار كما يحصل في النباتات الطافرة في مورثة AGAMOUS (AG)، فإن المرستيم الزهري يتصرف كأنه مرستيم فارعي ويستمر بإنتاج عدد غير محدد من الأجزاء. ومن الملاحظ أن WUS بحد ذاته هام في تحريض التعبير عن منظمه السلبي AG والذي يتمتع بدور عام في تحديد مركز الأزهار [22،21]. وعلى عكس الهدف الآخر لـ: WUS فان CLV3 المستمر بالتعبير عن AG لا يتطلب WUS مما يسمح باستمرارية التعبير عن AG حتى بعد توقف WUS عن العمل.

يتمتع مرستيم الجذر الأولي بوظيفة مشابهة تقريباً للمرستيم الفارعي حيث ينشأ عنه أنسجة



الشكل 2- المرستيم الفارعي الأولي لنبات ينمو خضرياً. المرستيم الفارعي في المركز محاط باثنتين من البداءة الورقية. المورثة STM (أخضر فاتح) تحافظ على الحالة غير المتمايزة عن طريق تثبيط AS1 (أحمر) والمعبر عنه في الخلايا المولدة للبداءة (PO) وكذلك في البداءة الصغيرة (P1,P2). لاحظ تمنطق المرستيم الذي يحدد خلايا طبقتي البشرة وتحت البشرة. الخلايا أسفل طبقة خلايا تحت البشرة غير مبينة.



الشكل 3- يحدد موقع الخلية مصيرها التطوري. مايشتق من الخلايا الجذعية (أصفر) يُدفع إلى المحيط الخارجي للمرستيم الفارعي ويصبح جزءاً من المرستيم الزهري، ثم يدمج إلى زهرة (للتبسيط تمّ تجاهل انقسامات هذه الخلية التي تجري ضمن رحلة التطور). يظهر التعبير عن الواسم المرستيمي STM باللون الأخضر الفاتح والتعبير عن واسم الخلايا الجذعية CLV3 باللون الأرجواني والتعبير عن WUS بالأحمر. لاحظ كيف تفقد هذه الخلية التعبير عن CLV3 عندما تغادر المرستيم الفارعي ولكنها تعود لاكتسابه في المرستيم الزهري؛ وتفقد هذه الخلية هوية الخلايا الجذعية مرة ثانية عند إزاحتها من مركز التكاثر (الملون بالأخضر) للزهرة المتنامية.

الجذر الرئيسي فقط؛ وتنشأ الجذور الجانبية من المرستيمات الثانوية التي تمّ نشوؤها من جديد كما سيتبين فيما بعد. ويتألف مرستيم الجذر الأولي من طبقتين من الخلايا الجذعية تتوضع مباشرة أعلى وأسفل المركز الساكن - غير المنقسم. وتنتج طبقة الخلايا الجذعية العليا معظم أنسجة الجذر بحيث تعطي كل خلية أنسجة ذات خلايا متخصصة (الشكل 4). ورغم أن هذا الأسلوب المجسم في إنتاج أنماط مختلفة من الخلايا يقترح عملية معتمدة على النسب في تحديد مصير الخلايا، إلا أن مصير الخلايا المتمايزة لا تمليه حقيقة الخلايا الجذعية التي تشتق منها، وإنما يحددعن طريق إشارات تصدر عن الخلايا المتمايزة الموجودة داخل طبقة النسيج ذاته [21]. وتساهم الخلايا البنات لطبقة الخلايا الجذعية السفلى في قلنسوة الجذر root cap التي تحمي قمة الجذر من التعزق أثناء حركته خلال التربة والتي يجب أن تُعوَّض باستمرار مع اهتراء الخلايا الأقدم للقلنسوة.

وعلى خلاف المرستيمات الزهرية، فإن المرستيمات الثانوية التي تنتج الجذور الجانبية من جديد من مجموعة صغيرة من الخلايا ضمن طبقة الأنسجة الداخلية للجذر تسمى "المحيط الدائر pericycle". بعد استقبال إشارة تشمل الأوكسين، تفقد الخلايا الناضجة داخل المحيط الدائر وضعها المتمايز وتبدأ بالانقسام. وعلى نحو ممتع، يبدأ مرستيم جذر جانبي - يعمل على صيانة ذاته - بالتشكل فقط بعد أن تبدأ هذه الخلايا حديثة التكوين بإنتاج أنسجة متمايزة نموذجية للجذر [24].

يوجد في الأجزاء الهوائية للنبات مرستيمات ثانوية لا تجاور المرستيمات الأولية والتي تنشأ من جديد؛ ومن أمثلتها المرستيمات البينية intercalary أو المقحمة بين السلاميات في النباتات العشبية التي تساهم في استطالة الساق، والمرستيمات القُلْبية cambial في النباتات الخشبية المسؤولة عن زيادة محيط الساق. وحتى مرستيمات فارعية تستطيع التشكل من جديد ولو أن ذلك يعد أمراً غير عادي. إنها تنشأ في محيط النبات الطبيعي كمرستيمات فارعية عرضية والتي تنتج، على سبيل المثال، الأفرع التي تتشكل على أجذع الأشجار أو حينما يكاثر النبات من جزء لعضو متمايز مثل قطعة من ورقة.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

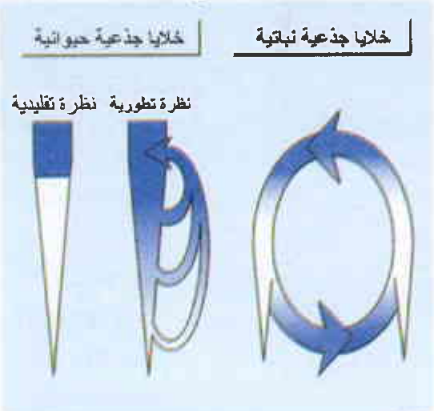
الخلايا الجذعية في النباتات والحيوانات

ماذا يمكن أن نتعلم إذاً من بيولوجيا الخلايا الجذعية النباتية؟ تتميز الخلايا الجذعية النباتية بكونها محصورة أومحددة بموقعها ضمن المرستيم وليس هناك حاجة لاستخدام واسمات جزيئية لتمييزها، ومثال ذلك الخلايا الجذعية في مرستيم الجذر (الشكل 4). ورغم أن ما سبق ذكره صحيح في بعض الخلايا الجذعية الحيوانية مثل الغدد التناسلية لذبابة الفاكهة أو الديدان [25] لكن ذلك يبدو أنه الاستثناء لا القاعدة، وعادة ما يكون استخدام الواسمات الجزيئية أمراً مطلوباً لتمييز الخلايا الجذعية الحيوانية ضمن مجموعة من الخلايا المتماثلة شكلياً. على كل حال، تكون البيئة الموضعية حاسمة من أجل صيانة الخلايا الجذعية الحيوانية، وهذه ملاحظة نجم عنها مفهوم أعشاش niches الخلايا الجذعية [25،26]. وهنالك بعض الحزيئات الضرورية للمحافظة على حيوية الخلايا الجذعية، مثل PIWI في الذباب وZWILLE/PINHEAD في النباتات، ذات قرابة وثيقة ببعضها، مما يدعو للدهشة إذا أخذنا بالاعتبار أن تعددية الخلايا نشأت غالباً بصورة مستقلة في النباتات عن الحيوانات [27].

إن أحد الأسباب وراء الاهتمام في الخلايا الجذعية الحيوانية حديثاً هو كونها أكثر تنوعاً مما كان متوقعاً مع احتمال ارتداد حتى الخلايا الواضحة التمايز إلى مصير خلايا جذعية [28]. لقد كانت النظرية التقليدية للخلايا الجذعية أنها تتبع طريقاً باتجاه واحد، من خلايا يمكن أن تعطي طيفاً كاملاً من أنماط الخلايا الناضجة إلى أشكال من الخلايا ذات الكمون التمايزي الضيق (الشكل 5). وعلى العكس، لم تكن خاضعة للتساؤل مطلقاً حقيقة التنوع الكبير جداً في خلايا النباتات . ومثال على بعض الخلايا الجذعية الحيوانية الأكثر أهمية هي تلك التي تنشأ عنها السلالة المنشئة germ line وهذه تعزل مبكراً خلال التطور الجنيني. من جهة أخرى، ليس للنباتات سلالة منشئة مقرّرة لكنها تولد خلايا منشئة بصورة متكررة خلال التشكل المستقل لكل زهرة من مجموعة للخلايا غير متمايزة.

آخذين بالاعتبار تعددية الاستخدام هذه هل من الممكن أن تصبح الخلايا النباتية تامة التمايز خلايا جذعية مرة أخرى؟ في حالة الحيوانات هنالك طريقة قياسية لتقدير صفات الخلايا الجذعية وتتمثل في ازدراع الخلايا الجذعية الكامنة ورصد الأنسال الخلوية cell lieages التي يمكن أن تساهم بها. ومن سوء الطالع، وبسبب كون الخلايا النباتية محاطة بجدار

الشكل 4- المرستيم الجذري الأولي في الجنين. تشير الأسهم السوداء إلى كيفية إنتاج الخلايا الجذعية عند انقسامها لمجموعات رأسية منتظمة من الخلايا. فوق المركز الساكن (أحمر) توجد الخلايا الجذعية لأنسجة الجذر: تبدو قلنسوة الجذور الجانبية والقشرة (بالأصفر) القشرة والأدمة الباطنة (بالأخضر الفاتح) والمحيط الدائر (أزرق فاتح) والأنسجة الوعائية (ارجواني). وفي الأسفل خلايا جذعية للجزء المركزي من قلنسوة الجذر (أخضر غامق). ويواصل المرستيم العمل بالطريقة ذاتها في الجذور بعد الانبات.



الشكل 5- مفاهيم الخلايا الجذعية: يظهر تغير المصير لخلية مفردة، فاللون الأزرق يشير إلى صفات الخلايا الجذعية مع تمايز باللون الأبيض. إمكانية التصرف كخلية جذعية تبينه كثافة اللون الأزرق. تعاني الخلايا الجذعية الحيوانية بالنظرة التقليدية تحولاً مفاجئاً من كونها كلية المقدرة أو متعددة المقدرة إلى كونها دخلت بصفة مستديمة مسار التمايز. من وجهة نظر تطورية، تفقد الخلايا بالتدريج قدرتها على الارتداد إلى مصير الخلايا الجذعية. من جهة ثانية، يعد أمراً عادياً في النباتات أن تتحول خلية متمايزة إلى خلية جذعية مرة أخرى. المخططان اليساري والوسطي [28].

خلوي صلب فإنه من غير الممكن ازدراع خلايا نباتية مفردة بسهولة في النباتات، إلا أنه يمكن جعل الخلايا النباتية تسلك شكلاً بديلاً لتكون الجنين يسمى "التكون الجنيني الجسمي somatic embryogenesis" وهي عملية لا تتطلب تشكل زيجوت zygote عن طريق الإخصاب. ويمكن أن يُحرَّض التكون الجنيني الجسمي بعد تفرقة الخلايا النباتية عن بعضها وزرعها لتشكل مستنبتاً مُعلّقاً، وتُعدّ الأجنة المبكرة الظهور أفضل المواد لإبداء تشكل المستنبتات ولو أنه بالإمكان استعمال الأنسجة البالغة. والطفرات التي تزيد حجم المرستيم الفارعي الجنيني تزيد أيضاً من النزعة التي تحرض بها الأجنة الجسمية، وهكذا يجري الربط بين وظيفة الخلايا الجذعية والتكون الجنيني الجسمي [29].

يمكن أيضاً أن تتشكل الأجنة الجسمية على أوراق نباتات تسيء التعبير في خلايا أوراقها عن أي من عاملي الإنتساخ المتورطين طبيعياً بالنضج الجنيني [30،31]. والملاحظة الأخيرة تدعم الاقتراح بأنه حتى الخلايا التامة التمايز يمكن أن ترتد ثانية إلى خلايا جذعيه هذا على الرغم من اقتراح أن عاملي الانتساخ المذكورين آنفاً يمليان ببساطة "حالة جنينية" مديدة على الخلايا الجسمية [32]. على أية حال، تبين هذه النتائج كافة، على خلاف الحيوانات، أن حالة كلّية المقدرة الكامنة totipotency في النباتات لا تنحصر بالزيجوت أو بالخلايا الجنينية المبكرة جداً الناشئة عنه.

لايُعدّ التكون الجنيني الجسمي الحالة الوحيدة التي تصبح فيها الخلايا الناضجة أو الآخذة بالنضج خلايا جذعية مرة أخرى. وأحد أمثلة التطور الطبيعي للنبات هو تطور الجذور الجانبية التي تنشأ من الخلايا البالغة للمحيط الدائر [24].

وتتمايز الخلايا الأخيرة بشكل مؤكد لتصبح النهاية القاعدية الجديدة داخل بداءة الجذر الجانبي [33] - حيث يعاد تموضع واسم القطبية الخلوي من مكانه الأصلي عند النهاية القاعدية للخلايا إلى الجانب الخارجي. وبصورة مشابهة، فإنه خلال التحريض المميز للمرستيمات الفارعية الإضافية عند زراعة الورقة يظهر التعبير عن STM (وربما التعبير عن CLV3 أيضاً) من جديد. على نقيض ما تعلمناه عن الأصل الجنيني وعن تعضية المرستيمات الأولية، فإننا لا نزال نعرف القليل جداً عن الأساس الجزيئي للتنوع في الخلايا النباتية المتمايزة. إن فهم آلية ارتداد التمايز في خلايا النبات لابدّ وأن يلقي الضوء على بيولوجية الخلايا الجذعية في أنظمة أخرى أيضاً

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

REFERENCES المراجع

[1] Mckay, R. Nature 406, 361 - 364 (2000).

[2] Jurgens, G. EMBO J. 20, 3609 - 3616 (2001).

[3] Hardtke, C. S.& Berleth, T. EMBO J. 17, 1405 -1411 (1998).

[4] Laufs, P., Grandiean, O., Jonak, C., Kieu, K. & Traas, J. Plant Cell 10, 1375 - 1390 (1998).

[5] Haecker, A. & Laux, T, Curr. Opin. Plant Biol.4, 441 - 446 (2001).

[6] Clark. S. E. Curr. Opin. Plant Biol. 4, 28 - 32 (2001).

[7] Benfey, P. N. & Scheres, B. Curr. Biol. 10, R813 - R815 (2000).

[8] Mayer, K. F. et al. Cell 95, 805 - 815 (1998).

[9] Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. & Meyerowitz, E. M. Science 283, 1911 - 1914 (1999).

[10] Trotochaud, A. E., Jeong, S. & Clark. S. E. Science 289, 613 - 617 (2000).

[11] Schoof, H. et al. Cell 100, 635 - 644 (2000).

[12] Brand, U., Fletcher, J. C., Hode, M., Meyerowitz, E. M. & Simon, R. Science 289, 617 - 619 (2000).

[13] van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. & Scheres, B. Nature 390, 287 - 289 (1997).

[14] Bossinger, G. & Smyth, D. R. Development 122, 1093 - 1102 (1996).

[15] Irish, V. F. & Sussex, I. M. Development 115, 745 - 753 (1992).

[16] Reinhardt, D., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. Plant Cell 12, 507 - 518 (2000).

[17] Vernoux, T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Laufs, P. & Traas, J. Development 127, 5157 - 5165 (2000).

[18] Byrne, M. E. et al. Nature 408, 967 - 971 (2000).

[19] Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L. & Hake, S. Development 127, 5523 - 5532 (2000).

[20] Long, J. & Barton, M. K. Dev. Biol. 218, 341 - 353 (2000).

[21] Lohmann, J. U. et al. Cell 105, 793 - 803 (2001).

[22] Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. & Laux. T. Cell 105, 805 - 814 (2001).

[23] van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek. P. & Scheres, B. Nature 378, 62 - 65 (1995).

[24] Malamy, J. E. & Benfey, P. N. Development 124, 33 - 44 (1997).

[25] Watt, F. M. & Hogan, B. L. Science 287, 1427 - 1430 (2000).

[26] Whetton, A. D. & Graham, G. J. Trends Cell Biol. 9, 233 - 238 (1999).

[27] Benfey, P. N. Curr. Biol. 9, R171 - R172 (1999).

[28] Blau, H. M., Brazelton, T. R. & Weimann, J. M. Cell 105, 829 - 841 (2001).

[29] Mordhorst, A. P. et al. Genetics 149, 549 - 563 (1998).

[30] Lotan, T. et al. Cell 93, 1195 - 1205 (1998).

[31] Stone, S. L. et al. Proc. Natl Acad. Sei. USA 98, 11806 - 11811 (2001).

[32] de Vries, S. C. Trends Plant Sci. 3, 451 - 452 (1998).

[33] Steinmann, T. et al. Science 286, 316 - 318 (1999).

[34] Teo, W. L. Kumar, P., Goh, C. J. & Swarup, S. Plant Mol. Biol. 46, 567 - 580 (2001).■

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

أخبار علميّة

1- اندماج خلوي يسبب إرباكاً*

يُعدّ "التمايز الانتقالي transdifferentiation" عملية لم تفهم بشكل جيد استُحدثت لتفسّر كيف يمكن لخلايا جذعية نوعية النسيج من فرد بالغ أن تولّد خلايا أنسجة أخرى؛ وهنالك نتائج جديدة تتحدّى وجود هذه العملية.

ربما سمع معظم القرّاء بنبأ الخلايا الجذعية وهي خلايا غير متخصِّصة يمكنها أن تولّد عدداً متنوعاً من الأنماط الخلوية الأكثر تخصُّصاً. وحتى عهدٍ قريب، كان يُظن أن الخلايا الجذعية الجنينية (ES cells) embryonic stem cells هي وحدها القادرة على توليد الأنماط الخلوية المختلفة كافة في جسم الكائن الثديي [1]، في حين تكون الخلايا الجذعية من فرد بالغ مقيّدة وأضعف في قدرتها الكامنة على التطوّر والتنامي. لكن الكثير من الباحثين لاحظوا، في الآونة الأخيرة، أن وظيفة الخلايا الجذعية العصبية أو المكوِّنة للدم المأخوذة من فرد بالغ لا تقتصر فقط على تشكيل خلايا خاصة بالجهاز العصبي المركزي أو بالدم، بل يمكنها أيضاً أن تولّد الكبد، وخلايا معوية، وعضلات قلبية وهيكلية؛ وقد اقترح هؤلاء أن الخلايا المذكورة قادرة على ذلك من خلال "تمايز انتقالي" (وهي عملية تكتسب فيها الخلايا قدرات أوسع وأعظم من حيث التطوّر والتنامي). وإذا كان ما سبق ذكره صحيحاً، فإنه يُعدّ في غاية الأهمية. وهذا يقتضي أنه يمكن لخلايا جذعية نوعية النسيج من فرد بالغ أن تأوي الكثير من القدرات الكامنة في الخلايا الجذعية الجنينية إذا لم يكن جميعها، الأمر الذي سيستبعد الحاجة إلى جمع خلايا جذعية من أجنّة بشرية لأغراض سريرية، وهذا بدوره سيتيح التغلّب على الكثير من العوائق السياسية والأخلاقية أمام أسلوب المعالجة بالخلية الجذعية.

غير أن ينغ Ying وآخرين [2] وكذلك تيرادا Terada [3] أثاروا، في الوقت الراهن، شكوكاً حول ما إذا كانت عملية "التمايز الانتقالي" تحدث بالفعل؛ إذ تمكّن هؤلاء من تبيان أن خلايا ES يمكنها حثّ خلايا جذعية عصبية [2] أو مجموعات خلوية من نقي العظم محتوية على خلايا جذعية مكوِّنة للدم [3] كي تغيّر تمايزها وتتحول إلى خلايا جذعية أشبه بالجنينية عندما يجري استنباتها مع بعضها البعض في الزجاج. وكبديل لما سبق، وجد هؤلاء الباحثون أن الخلايا الجذعية من فرد بالغ تندمج تلقائياً مع خلايا ES متبنية خصائصها، وهو حدث أُسيء سابقاً فهمه وتفسيره كعملية تمايز انتقالي.

يعتمد أحد اختبارات التمايز الانتقالي في الزجاج على فكرة مفادها أن قيود التنامي للخلايا الجذعية النوعية النسيج تُملى بواسطة البيئة المحيطة بها، وأن إشارات جديدة محرِّرة لهذه القيود يمكن أن تقدّمها خلايا من نسيج آخر. وفي عدة تجارب، على سبيل المثال، عُزلت خلايا جذعية عصبية من الجهاز العصبي المركزي للفئران وجرى وسمها ببروتين واسم، مثل β - غلاكتوسيديز أو البروتين المفلور الأخضر (GFP) اللذين يجعلان هذه الخلايا سهلة الاقتفاء، ثم جرى استنباتها مع أنماط خلوية أخرى. كانت النتيجة مذهلة، فعندما جرى استنبات الخلايا الجذعية العصبية المعبِّرة عن الواسمين المذكورين آنفاً مع أرومات عضلية myoblasts (وهي مولِّدات الخلايا العضلية الهيكلية) أو مع أجسام مضغية embryoid bodies (منتجة من خلايا ES)، تمايزت هذه الخلايا وتحوّلت إلى أنابيب عضلية هيكلية myotubes (خلايا عضلية) موسومة بـ β - غلاكتوسيديز أو بـ GFP [4-6]. كذلك، تمايزت خلايا جذعية عصبية موسومة بـ GFP متحوّلة إلى خلايا عضلة قلب موسومة بـ GFP عندما جرى مزجها مع خلايا عضلة قلب من فئران حديثة الولادة [7]؛ واستُنتج أن الخلايا الجذعية قد حقّقت التحوّل المذكور عبر عملية تمايز انتقالي [5، 7] رغم وجود تفسيرات أخرى لذلك (الشكل 1a).

لقد كانت التجارب التي قام بها ينغ وآخرون [2] وتيرادا وآخرون [3] مغايرة من منطلق أن مجموعتي الخلايا البدئية كلتيهما كانتا موسومتين بواسمات متميزة بحيث مكّنت المؤلفين من اقتفاء المصير لكلِّ نمط خلوي. قام ينغ وزملاؤه [2] بعزل خلايا جذعية عصبية من فئران لديها جينتان - واحدة منهما تُرمِّز (تكود) GFP والأخرى تُرمِّز بروتيناً يمنح مقاومة لصادة البيورومیسین puromycin - مرتبطتان بمنطقة تحكّم من الجينة Oct4 التي لا يُعبَّر عنها إلّا في خلايا ES [8]؛ وقد جرى استنبات هذه الخلايا مع خلايا ES سبق أن تمّت هندستها وراثياً لتشتمل على جينة الهيغروميسين فسفوترانسفريز hygromycin phosphotransferase gene التي تمنح مقاومة لصادة الهيغروميسين. أما بيئة المستنبت فكانت بيئة نمو الخلية ES تحتوي على البيورومیسین، وذلك لانتخاب ضد خلايا ES الأصلية المذكورة آنفاً.

وبعد 2 - 4 أسابيع، استعاد المؤلفان عدة مستعمرات خلوية عبّرت عن الـ GFP وكانت مقاومة للبيورومیسین، الأمر الذي يشير إلى أنها كانت مشتقة من خلايا عصبية جذعية لكنها أصبحت شبيهة بخلية ES من حيث خصائص نموها ومن حيث التعبير المسيَّر بجينة Oct4 الخاص لهذين الواسمين. وعندما يؤخذ الأمر بمفرده، فإن ما سبق ذكره يُفسَّر على أنه دليل على حدوث تمايز انتقالي؛ لكن المفاجىء هو أن الخلايا عبّرت أيضاً عن الهيغروميسين فسفوترانسفريز (الذي لا يمكن أن يأتي إلّا من خلايا ES)؛ هذا بالإضافة إلى أنه كان لثمانية عشر خطاً (وراثياً) من الخلايا التي عُزلت بشكلٍ مستقل ضعف (أو ما يقارب ضعف) المحتوى الطبيعي من الدنا. وهكذا، استنتج ينغ وزملاؤه أن الخلايا الشبيهة بخلية ES نشأت نتيجة اندماج بين الخلايا الجذعية العصبية والجنينية بدلاً من نشأتها بعملية تمايز انتقالي (الشكل 1b).

وبشكلٍ مستقل، اتبع تيرادا وزملاؤه [3] أسلوباً مشابهاً (الشكل 1c) عن طريق استنبات خلايا ES مع مجموعات خلوية من نقي العظم (غنية بخلايا جذعية مكوِّنة للدم) عبّرت عن الـ GFP والجينة المقاومة للبيورومیسین. وقد أُضيف البيورومیسین للتخلص من خلايا ES، كما

* نُشر هذا الخبر في مجلة Nature, Vol.416, 4 April 2002 ترجمة هيئة التحرير - هيئة الطاقة الذرية السورية.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

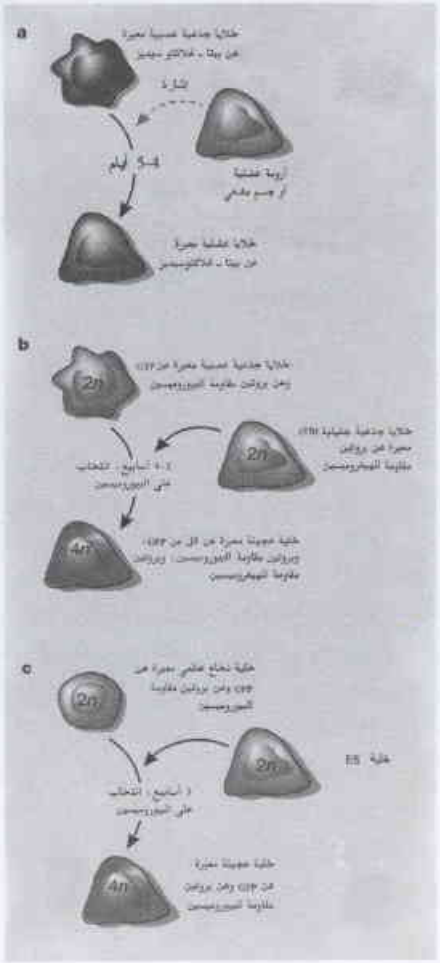
سُحب الجزيء المشير "إنترلوكين-3 interleukin" لكبح نمو خلايا نقي العظم؛ وهذا سبَّب ظهور مستعمرات متكاثرة لخلايا موسومة بالـ GFP، ومقاومة للبيوروميسين، ومحاكية لخلايا ES في مظهرها وحركيات نموها؛ كذلك عبّرت هذه الخلايا عن البروتينات الواسمة للخلية الجذعية، وتمايزت إلى خلايا عضلة القلب بعد إزالة عوامل النمو؛ وربما كان هنالك تفكير بأن هذه الخلايا أيضاً ناشئة عبر عملية تمايز انتقالي. لكن تيرادا وزملاءه وجدوا أن لاثنين من الخطوط الوراثية الخلوية أربعة صبغيات جنسية (XXXY، علماً أن الصبغي Y جاء من الخلايا الجذعية الجنينية) وأن 11 منها يحتوي على ضعف الكمّية المعتادة من الدنا، الأمر الذي يوحي مرّة ثانية بحدوث اندماج خلوي.

هل كان ممكناً، في دراسات سابقة، إساءة فهم الاندماج الخلوي وتفسيره على أنه تمايز انتقالي؟ كان من عوامل تعقيد هذا الموضوع رؤية حدوث التمايز الانتقالي في 7-57% من مجموعات الخلايا الجذعية العصبية الناجمة عن مقايسات استنبات مختلط [5، 6]، في حين تمكّن ينغ وزملاؤه [2]، وكذلك تيرادا وزملاؤه [3] من كشف اندماج خلوي عند التواتر المنخفض الذي يقع بين 1 في 10^4 إلى 1 في 5×10^5. وقد يكون المعدّل الفعلي للاندماج أعلى مما سبق ذكره؛ حيث إن قساوة أسلوب الانتخاب وطول فترة الاستنبات اللازمة لمقايسة اندماج خلوي (بالمقارنة مع تجارب التمايز الانتقالي التي يمكن إنهاؤها خلال فترة 4 - 5 أيام [5، 7]) قد يؤديان، وبشكلٍ مضلّل، إلى سويات منخفضة من الاندماج الخلوي القابل للكشف وذلك بفعل الموت الخلوي. وكبديل لما سبق، قد يكون الاندماج الخلوي بالفعل أمراً نادر الحدوث بشدة وبالتالي فهو ليس قادراً على تفسير تمايز انتقالي لخلايا جذعية من فرد بالغ، يُضاف إلى ذلك الاحتمال بأن يعمد الأسلوب القاسي [2، 3] إلى سوق الاندماج الخلوي، بشكلٍ صنعي، ليكون واسطة وحيدة يمكن من خلالها للخلايا أن تبقى على قيد الحياة وتتكاثر. وسيترك للمستقبل اكتشاف فيما إذا كانت الخلايا ستندمج تحت ظروف أقل انتقائية.

إضافة لما سبق، لم يجرِ، حتى الآن، الكشف عن اندماج خلوي إلّا في الزجاج [2، 3]. من ناحية ثانية، اعتُبرت ملاحظات متحصَّل عليها في الزجاج والحي كليهما كدليل على حدوث تمايز انتقالي. على سبيل المثال، أمكن تبيان أن خلايا جذعية عصبية وخلايا نقي العظم مزدرعة داخل فئران ستسهم في تكوين الجهاز العصبي المركزي، والدم، والكبد، والعضلات [2، 3]. ومع ذلك، يبقى ممكناً من الناحية النظامية أن يشكّل الاندماج الخلوي عملية ذات شأن في الحي، مما يجعل إعادة فحص البيانات المتحصَّل عليها في الحي أمراً مهمّاً. وعلى وجه الخصوص، تُعدّ نقاط الخلاف المذكورة آنفاً مُلحّة في حالات تتحوّل فيها خلايا جذعية نوعية النسيج إلى خلايا متعددة النوى، كما هو الحال في الأنابيب العضلية الهيكلية وفي عصبونات بوركنج Purkinje neurons [5، 9].

ورغم الأسئلة المذكورة آنفاً، تظل إمكانية اندماج الخلايا أمراً ملفتاً للنظر رغم وجود تعقيدات كثيرة تعترض اندماج الأغشية. فعلى سبيل المثال، تتضمّن عملية اندماج الأغشية داخل الخلايا آلية جزيئية معقّدة تساهم فيها بروتينات تُعرف بالاسمين SNAREs و Rabs [10]. ولا تزال آلية الاندماج الخلوي غير معروفة، لكن تأثرات بين جزيئات غشاء البلازما في الخلايا قيد الاندماج قد تربط الخلايا مع بعضها لتحاكي جزئياً وظيفة البروتينين SNARE و Rab.

وفي الختام، نشير إلى أنه من السمات المشوِّقة للخلايا المندمجة [2، 3] تمتعها بكثير من خصائص الخلايا الجذعية الجنينية، مما يوحي بسيادة البرنامج الوراثي الجنيني على ذلك الخاص بالخلايا الجذعية من فردٍ بالغ. لهذا، قد يمنح الاندماج الخلوي واسطة لتحديد هوية بروتينات تجعل من الخلايا الجذعية الجنينية خلايا ذات استخدامات ووظائف متعددة. لكن الأمر الذي في غاية الأهمية هو أن النتائج الجديدة تستدعي القيام بتحليل وراثي مفصَّل للخلايا التي اعتُقد سابقاً أنها تخضع لعملية تمايز انتقالي، كما أنها تؤكد الحاجة إلى تعريف هذه العملية وآلياتها بحيث يغدو بالإمكان تشخيصها بشكلٍ أدق في المستقبل. وحتى ذلك الحين، قد لا يكون من الحكمة في شيء وضع تعاميم أو سياسات تقيّد الجهود من أجل فهم سلوك الخلايا الجذعية الذي لا يزال أمراً محيّراً.



الشكل 1- هل يمكن لخلايا جذعية من فرد بالغ أن تتمايز انتقالياً إلى أنماط خلوية أخرى؟ (a) في عمل سابق [4، 5]، جرى استنبات خلايا جذعية عصبية، موسومة بـ β - غلاكتوسيديز، مع خلايا أورمة عضلية أو أجسام مضغية وذلك لإنتاج خلايا عضلية موسومة بـ β - غلاكتوسيديز؛ وفُسّر هذا كدليل على أن الخلايا الجذعية تلقّت إشارات سيَّبت لها أن تتمايز انتقالياً إلى خلايا عضلية. لكن هنالك احتمالات أخرى، فمن الممكن أن تكون الخلايا الجذعية قد تلوّثت بمولّدات لخلايا عضلية، أو أن عدداً قليلاً منها قد تطفّر، أو أنها قد اندمجت مع خلايا أورمات عضلية أو أجسام مضغية. (b) قام ينغ وآخرون [2] باستنبات خلايا جذعية عصبية، مقاومة للبيوروميسين ومعبّرة عن البروتين المفلور الأخضر (GFP)، مع خلايا جذعية جنينية (ES) مقاومة للهيغروميسين. بعد إجراء الانتخاب، عبّرت الخلايا التي بقيت حية عن GFP، وكانت مقاومة للبيوروميسين والهيغروميسين، وكانت تملك ضعف الكمّية الطبيعية من الدنا (4n مقابل 2n). ما سبق ذكره يوحي بأن الخلايا قد نشأت بالاندماج. (c) قام تيرادا وآخرون [3] باستنبات خلايا نقي العظم، موسومة بالـ GFP ومقاومة للبيوروميسين، مع خلايا جذعية جنينية. الخلايا الناتجة عبّرت عن GFP، وكانت مقاومة للبيوروميسين، كما تمتّعت بخواص الخلية الجذعية الجنينية، وكانت تمتلك أيضاً ضعف المحتوى المألوف من الدنا.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

بداية الحياة بل هو سلسلة متواصلة للحياة بشكلٍ جديد. لذلك، كانت المعضلة الحقيقية هي التهديد الملحوظ لقدسية اتحاد البويضة مع النطفة لخلق فردٍ جديد.

ولسوء الحظ، فإن اتحاد البويضات البشرية مع النطاف يكون، إلى حدٍّ بعيد، فاشلاً أكثر من كونه ناجحاً في إنتاج كائنٍ جديد. والمعدّل العالي لهذا الفشل مع عدم القدرة على منعه هو الذي قاد إلى مخزونات مروِّعة من الأجنّة البشرية المجمّدة في أنحاء العالم كافة. وبدلاً من السؤال حول ما إذا كان ممكناً استخدام هذه الأجنّة كي تُستمدّ منها الخلايا الجذعية، كان حريّ بنا أن نسأل لماذا تمّ خلق هذا العدد الكبير منها؛ وهل يجب المضي في خلق المزيد منها من أجل غاية وحيدة، ألا وهي استمرار الخلايا الجذعية، كما جرى فعله مؤخراً لدى مستوصف فرجينيا؟

الجواب على السؤال السابق هو "لا"؛ حيث بالإمكان تطوير تقانات أخرى لإنتاج الخلايا الجذعية بمزايا طبية أعظم. فالمداواة بالخلية الجذعية تحمل في طياتها بشائر النجاح كطريقة لاستبدال الخلايا المصابة أو العليلة داخل أعضاء بالغة. والأسلوب الأمثل، في محاولة طبية كهذه، يكون باستخدام خلايا من الفرد المصاب أو العليل. فللبويضات قدرة، من خلال آلية لم تُعرف حتى الآن، على إعادة نمذجة نواة الخلية البالغة وتحويلها إلى بنية "سلفية النواة pronucleus"، وهي أول نواة متشكّلة بواسطة بويضة منشَّطة والتي تنتج بدورها خلية جديدة تتمتع بإمكانيات ضخمة موسعة للنمو والتطوّر إلى عدد متنوع من الأنماط الخلوية؛ وهذه هي القدرة التي يجب تسخيرها واستخدامها.

ويُعدّ أسلوباً بديلاً تنشيط البويضة مع ما تحمله من مادة وراثية لم تُمسّ (تناسل عذري parthenogenesis). وسوف تعاني الخلايا الجذعية المستمدَّة من أفراد عذريين نصف قدر مشكلات رفض النسيج التي تعانيها خلايا جذعية مستمدَّة من بويضات ملقَّحة بالنطاف، والتي ستعاني القدر ذاته من مشكلات توافق النسيج tissue compatibility كما هو الحال في الأعضاء المزدرعة.

وقد تكون المراحل الأولى لتطوير الإجراءات المذكورة آنفاً مشابهة لتلك التي تُستخدم لاستنسال الأفراد؛ لكنه، مع تقدم الوقت، سوف تزداد كفاءة خلق خلايا جذعية متناغمة وراثياً من بويضات منشَّطة كما سوف تتضاءل الإمكانية لتطوير نسلٍ ما. وهذا يستوجب بدوره أنه في الحالة التي لا يكون الهدف فيها خلق نسلٍ ما، سيصبح تعبير "الجنين embryo" غير دقيق، وسيكون تعبير "الاستنسال cloning أكثر دقة، ولو أنه يُستخدم بشكلٍ عام لتوصيف عددٍ متنوع من الإجراءات التجريبية. لهذا، كان اقتراحي للتعبير "مناسل بويضة منشَّطة ovasomagenesis" لتوصيف العملية، والتعبير "بويضة منشَّطة ovasome" لتوصيف ناتج تنشيط بويضة كي تصبح خلية جسدية.■

المراجع REFERENCES

[1] Gardner, R.L.& Beddington, R.S.J. Cell Sci. 10 (suppl), 11-27 (1988).

[2] ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. & Smith, A. G. Nature 416, 545-548 (2002);online 13 March 2002 (DOI 10.1038/nature 729)

[3] Terada, N. et al. Nature 416, 542-545 (2002); online 13 March 2002 (DOI 10.1038/nature730)

[4] Clarke, D. L. et al. Science 288, 1660-1663 (2000).

[5] Galli, R. et al. Nature Neurosci. 3, 986-991 (2000).

[6] Rietze, R. L. et al. Nature 412, 736-739 (2001).

[7] Condorelli, G. et al. Proc. Natl Acad Sci. USA 98, 10733-10738 (2001).

[8] Yeom, Y. I. et al. Development 122, 881-894 (1996)

[9] Priller, J. et al. J. Cell Biol. 155, 733-738 (2001).

[10] Clague, M. J. Curr. Biol. 9, R258-R260 (1999).■

2- مفاهيم جديدة تتطلب كلمات جديدة في جدل الخلية الجذعية*

ينشأ ارتباك عندما تكون المفردات الحالية التي نستخدمها غير مناسبة لتوصيف منهجيات وطرائق حديثة.

سيدي – لقد ألمحتَ في مقالك "معنى الحياة The meaning of life" أن الاقتراح، الذي قدَّمته الهيئة الاستشارية لأخلاقيات التقانات الخلوية المتقدمة بشأن إحلال التعبير "ovumsum" محل تعبير "الجنين embryo" في حالة البويضات المنشَّطة عقب انتقال نووي، يُعدّ محاولة لتجنب المشكلة الأخلاقية المتزامنة مع عملية اشتقاق الخلايا الجذعية من الأجنّة البشرية. إن تلميحكم هذا ليس صحيحاً.

فأنا عضو في الهيئة التي اشتقَّت التعبير "ovasome" (وليس "ovumsum") لأسباب تتعلق بدقة اللغة وليس عن رغبة في تجنُّب مشاكل مثيرة للجدل. والكثير من الارتباك الحالي داخل كونغرس الولايات المتحدة ناجم عن توصيف الطرائق الحديثة باللغة المتداولة.

إن صلب الموضوع يكمن في الخواصّ الرائعة للبويضات. ولأن البويضات أو النطاف لا تموت قبل الإخصاب، كما أشرت إلى ذلك في مقالك، فقد نشأ جدل فرض نفسه بالقوة يفيد بأن الإخصاب لا يُعدّ

* نُشر هذا الحبر في مجلة *Nature*, Vol.413, 4 October 2001. ترجمة هيئة التحرير – هيئة الطاقة الذرية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

3- طعوم جنينية للعصبون تمهّد الطريق لعلاجات بالخلية الجذعية*

إن عقداً من المعالجات التجريبية، استُخدمت فيه عصبونات جنينية لتحلّ محلّ خلايا دماغية ماتت بفعل الإصابة بمرض باركنسون Parkinson's disease، يمكن أن يقدّم دروساً في التخطيط لعلاجات بالخلية الجذعية.

لعلّ عالِم الأعصاب السويدي أندرس بجوركلوند A. Björklund وزملاءه قد التقطوا لمحات لما يخبئه المستقبل من أجل معالجة أعضاء أصابها الفشل. فلأكثر من عشر سنوات، كان بجوركلوند جزءاً من فريق لدى جامعة لوند Lund في السويد حيث كان يقوم بتطعيم عصبونات من أجنّة مُجهَضة داخل دماغ مرضى مصابين بداء باركنسون. وفي العديد من الحالات، أمكن، بشكلٍ مثير، للخلايا المزدرعة أن تخفّف أعراض المرض المشتملة على تباطؤ في الحركة والصّلادة. ذلك تماماً هو نوع العلاج الذي يأمل باحثو الخلية الجذعية يجعله روتينياً لعلاج ضروب الأمراض التنكسية كافة إذا تمكّنوا من حث الخلايا كي تنمو وتتحوّل إلى مخزون لا حدّ له من الأنماط الخلوية النوعية التي يمكن استخدامها لإصلاح أو استبدال الأعضاء المعطوبة.

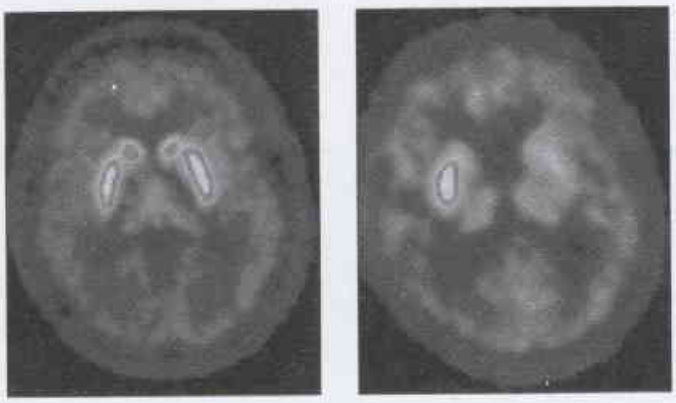
ورغم أن المعالجة الحالية لداء باركنسون تستخدم خلايا جنينية سبق لها أن نمت وتحوّلت إلى نوع خاص من العصبونات، إلّا أن النتائج الواعدة في هذا السياق، كما يقول بجوركلوند، تشكّل إثباتاً لمبدأ مفاده أن استبدال الخلية سينجح فعلاً كطريقة في العلاج. لقد قدّمت النتائج للباحثين مزيداً من الثقة بأنهم إذا تمكّنوا من مناولة وحثّ الخلايا الجذعية كي تنمو متحوّلة إلى نوع العصبون الذي تستخدمه حالياً مجموعة لوند وآخرون غيرها - وهذا يُعدّ تحدّياً ضخماً - عندها ستضطلع الخلايا الجديدة بعمل الخلايا المعطوبة داخل دماغ المرضى المصابين بداء باركنسون. وفي حال تحقق ما سبق ذكره، فإن معالجة داء باركنسون ستكون ضمن أولى تطبيقات المداواة بالخلية الجذعية.

كذلك، زادت النجاحات من الحاجة الملحّة إلى تطوير علاجات بالخلية الجذعية والتي، رغم كونها واعدة، لا يزال هنالك كثير من الأسباب المؤيدة لفكرة أن الخلايا الجنينية لن تُستخدم أبداً على نطاق واسع لمعالجة داء باركنسون. وتُعزى هذه الأسباب إلى اهتمامات أخلاقية (كاعتراضات معارضي الإجهاض التي قادت حاكم نبراسكا إلى أن يطالب بإلحاح وقف الأبحاث المتورّطة بالأنسجة الجنينية والقائمة لدى جامعة نبراسكا) تعود إلى حقيقة أنه لن يكون هنالك مطلقاً القدر الكافي من الأنسجة الجنينية لمعالجة جميع الأفراد المحتاجين إليها. ومن المعروف أن داء باركنسون يبتلي مليون شخص في الولايات المتحدة بمفردها.

وينظر الباحثون حالياً بدقة إلى نتائج متحصَّل عليها من ازدراع الخلايا الجنينية، وذلك من أجل استخلاص دروس تساعدهم على توجيه أبحاث مستقبلية في مجال الخلايا الجذعية. ولا يزال هنالك الكثير من الحواجز التي يجب التغلّب عليها، لكنّ الحلقة الأولى هذه من الاستبدال الخلوي في الدماغ تشكّل، برأي الباحث إيفان سنيدر E. Snyder من كلّية هارفرد الطبية في مدينة بوسطن، "معياراً ذهبياً" يجب على الخلايا الجذعية أن ترحب به إذا قُدّر لها أن تصبح الأساس في معالجات جديدة لداء باركنسون.

ويُعدّ داء باركنسون مرشّحاً منطقياً للعلاج بالاستبدال الخلوي، وذلك عائد جزئياً إلى أنه كان للعلاجات التقليدية نجاح محدود. ويسبّب المرض الموت الذي يصيب، لأسباب غير معروفة، مجموعة خاصّة من عصبونات الدماغ المنتجة للدوبامين dopamine، وهي إحدى المواد الكيميائية التي تنقل الإشارات بين الخلايا العصبية. والأفراد المبتلون بالمرض يفقدون التحكّم بحركاتهم ليصبحوا في نهاية المطاف مصابين بحالة الصلد. وقد وجد أن المعالجة بمادة ليفودوبا levodopa (L-dopa)، وهي عقار يتحوّل بوساطة الدماغ إلى دوبامين، تخفّف من هذه الأعراض، لكنّ فاعلية هذا العقار تتضاءل مع الاستمرار في موت العصبونات. وفي البداية، حاول الباحثون استبدال الخلايا المنتجة للدوبامين بتطعيم خلايا المنطقة المصابة بخلايا مأخوذة من لب غدة الكظر؛ وهذه الخلايا ليست عصبونات لكنها تصنع الدوبامين ويمكن أن تُستحثّ لتصبح شبيهة بالعصبونات. وقد أدّى العلاج المذكور آنفاً إلى إبطال أعراض داء باركنسون في الفئران لكنّه أحدث قليلاً من التحسّن الدائم لدى المرضى من بني البشر، وربما كان ذلك عائداً، حسبما يقول جون سلادك J. Sladek، رئيس قسم علم الأعصاب لدى مدرسة شيكاغو الطبية، إلى موت الخلايا أو إحجامها عن صنع الدوبامين.

وكان للباحثين حظٌّ أفضل عند تطعيم عصبونات غير ناضجة مأخوذة من أجنّة بشرية مجهضة. وقد أبدى عشرات المرضى ممن تلقوا طعوم الدوبامين التجريبية هذه، خلال السنوات العشر الماضية، انخفاضاً في أعراض المرض وصل لغاية 50%؛ ويبدو أن هذه التأثيرات كانت مستديمة. ومن خلال تصوير الدماغ



مثابرة وإصرار. كما هو مبيّن في المنطقة الملوّنة بالأحمر والأبيض، فإن طُعماً جنينياً تمّ ازدراعه في دماغ مريض بداء باركنسون قبل عشر سنوات (الصورة اليمنى) لا يزال ينتج سويات طبيعية من الدوبامين. تبيّن الصورة اليسرى مسحاً لدماغ طبيعي.

* نُشر هذا الخبر في مجلة *Science*. Vol.287, 25 February 2000. ترجمة هيئة التحرير - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

باستخدام التصوير المقطعي الطبقي بالإصدار البوزتروني، أعلن أوليه لندفال O. Lindvall من جامعة لوند وفريق من زملائه العاملين لدى هذه الجامعة ولدى مشفى هامرسميث Hammersmith في لندن، في عدد كانون الأول من مجلة Nature Neuroscience، أن العصبونات المزدرعة في أحد المرضى لا تزال على قيد الحياة وتصنع الدوبامين لمدة 10 سنوات بعد الجراحة. وكان هذا مشجعاً، كما يقول الباحث المتخصص بازدراع الأعصاب أولي إيساكسون O. Isacson من مدرسة هارفرد الطبية، إذ يبدو أن أي شيء في الدماغ قتل عصبوناته المنتجة للدوبامين لم يقتل الخلايا التي جرى ازدراعها.

ولا تزال الازدراعات الخلوية الجنينية مبتلاة بمشاكل لا يمكن التغلّب عليها إطلاقاً. وبالإضافة إلى الهموم الأخلاقية المتعلّقة بتنقية العصبونات من الأجنّة المجهَضة، هنالك مشاكل عملية؛ إذ لا بد من توفير ستة أجنّة لتقديم مادة تكفي لمعالجة مريض واحد بداء باركنسون، وهذا عائد جزئياً إلى أن عدداً من العصبونات يتراوح بين 90%-95% يموت بعد فترة قصيرة من تطعيمها. وفي الحقيقة، إن المخزون الخلوي – كما يقول لوند بجوركلوند – محدود إلى درجة لم يستطع الباحثون عندها اختبار بعض الوسائل المحتملة لمزدرعات خلوية جنينية. والعصبونات التي تموت عند الإصابة بداء باركنسون تنشأ في الأصل من منطقة دماغية يُطلق عليها اسم المادة السوداء substantia nigra وترسل محاورها الطويلة إلى عدة مناطق أخرى حيث تحرّر مادة الدوبامين. وحتى الآن، لم يتمكّن الباحثون من وضع الطعوم الخلوية إلّا داخل واحدة من هذه المناطق، ألا وهي منطقة "البيوتامن putamen★"؛ وحتى داخل هذه المنطقة، لم يتمكّنوا حتى تاريخه، وفي معظم الحالات، من ازدراع قدرٍ من العصبونات يكفي لاستعادة السويات الطبيعية للدوبامين.

وحتى إذا تمكّن الباحثون من تطوير تقنيات تقلل ظاهرة التموت الخلوي الجنيني، فإنه لن يتوفّر إطلاقاً القدر الكافي من الأجنّة لجعل تقنيات كهذه "إجراءً قابلاً للتطبيق كلّ يوم"، كما يقول الباحث سلادك. ومما يزيد الأمر حدّة أن المادة الدماغية المستردة من الأجنّة المجهَضة "تبرز بشكلٍ يصعب معه جعلها مادة قياسية" من حيث الجودة والنقاوة كما يقول بجور كلوند؛ وهذا ربما يفسّر السبب في أن بعض المرضى يُشفون، إلى حدٍّ بعيد، بشكلٍ أفضل من مرضى آخرين، الأمر الذي يُعدّ ارتياباً غير مقبول في علاج طبي قياسي.

وهكذا، يُعلّق الباحثون آمالهم على خلايا جذعية مستنبتة، وهم بذلك يستبعدون اعتمادهم المستمر على أجنّة مجهَضة، ولو أن الهموم الأخلاقية لن تخلد إلى الراحة كلّياً إلّا إذا تمكّن الباحثون من استخدام خلايا جذعية متحصَّل عليها من الأفراد البالغين بدلاً من الأجنّة. وهكذا، تصبح المؤونة من الخلايا المستنبتة غير محدودة، مما يسمح بإجراء اختبارات لطعوم داخل البيوتامن وربما أيضاً داخل مناطق دماغية أخرى. إضافة لما سبق ذكره، يغدو ممكناً جعل المعالجة الخلوية إجراءً قياسياً مُسيطَراً عليه يضمن التوصّل إلى نتائج أفضل من حيث إمكانية التنبؤ بها. وفي هذا السياق، يتنبأ عالِم الأعصاب رون ماكي R. McKay لدى المؤسسة الوطنية للاضطرابات والسكتة العصبية، الذي يعمل فريقه حالياً على إيجاد طرق لاستنبات خلايا عصبية، فيقول: "إن القدرة على تنمية الخلايا موضع الاهتمام (الخلايا الجذعية) ستجعل منها تقانة روتينية".

لكنّ جعْل هذا العالم الجديد والشجاع لتقانة استبدال الخلايا حقيقة واقعة يفرض أولاً على الباحثين أن يتعلموا كيفية المحافظة على الخلايا الجذعية في حالة انقسام للعديد من الأجيال داخل المستنبت، ومن ثم أن يكونوا قادرين على قدحها كي تتمايز متحوِّلة إلى نوع العصبون الذي يرغبون فيه. ومن المفترض أن تتمتع الخلايا الجذعية بمقدرة على التمايز والتحوّل إلى أي من عدة أنواع مختلفة من عصبونات الدوبامين التي يحويها الدماغ، لكن الأمر المهم والحاسم هو استخدام النوع المحدَّد من عصبونات الدوبامين التي تموت عند الإصابة بداء باركنسون. ويقوم الباحثون ممن يصنعون ازدراعات خلوية جنينية بإجراء انتخاب نوعي لهذه العصبونات المعروفة باسم العصبونات السوداء nigral neurons، حيث تنشأ أصلاً داخل المادة السوداء عندما يحصدون عصبونات للتطعيم من الأدمغة الجنينية. وكما يقول سلادك، فإن العصبونات السوداء تكون "مبرمجة وراثياً ومصمَّمة لتُكوِّن عصبونات دوبامين في الدارة الدماغية المناسبة.

إن القدرة على تنمية الخلايا موضع الاهتمام (الخلايا الجذعية) ستجعل منها تقانة روتينية.

وبالإضافة إلى أشياء أخرى، تستجيب العصبونات السوداء بشكل أفضل للظروف المحلية منتجة القدر الكافي من الدوبامين. وقد أظهرت الخبرة والممارسة عند المعالجة بالعقار L-dopa أن إعطاء كمّية زائدة من هذا المرسل العصبي سيُحدث القدر ذاته من المشاكل التي يحدثها إعطاء كمّية قليلة منه، مسبّباً حركات تشنجية غير مسيطر عليها. وينتاب الباحثين القلق من احتمال أن تصبح الخلايا الجذعية، التي سبق أن حُرِّضت لتتحوّل إلى عصبونات الدوبامين، ضرباً من أنواع العصبونات غير السوداء nonnigral التي لا تُنظَّم خرجها من الدوبامين بالطرق المناسبة. وفي هذا السياق، يقول الباحث سلادك: "إنها مشابهة لعملية وضع المنوِّبة الصحيحة داخل سيارتك، فإن وضعت واحدة منها مصمَّمة لطراز آخر من السيارات فإنها لن تعمل بالكفاءة ذاتها".

ولعلّ تحريض الخلايا الجذعية كي تتمايز إلى النوع الصحيح من العصبون يمثّل جزءاً فقط من المشكلة. فالعصبونات، في وسطها الطبيعي، تكون محاطة بخلايا داعمة يُطلق عليها اسم "الدبق العصبي glia" الذي يُغذّي العصبونات، كما يعمل على تعديل نشاطها؛ لذلك، يفيد الباحث سنايدر – العامل لدى كلّية هارفرد الطبية – أن الازدراعات الخلوية المثلى لا تتطلّب استبدال عصبونات الدوبامين فقط بل تتطلّب أيضاً استبدال الدبق العصبي الذي يحيط بها عادة.

★ بيوتامن= putamen: هو الجزء الأضخم والأشد توضّعاً جانبياً من النواة العدسية الشكل المنفصلة عن الكرة الشاحبة globus pallidas بواسطة الصفيحة النخاعية الجانبية lateral medullary lamina.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

غير أن بعض الباحثين يعتقدون أن الدماغ نفسه قد يكون قادراً على قهر الحواجز الخاصة بإنتاج كلٍّ من العصبونات المناسبة والخلايا الداعمة لها. ففي تجارب على الحيوان، بيّن المختبر الذي يعمل فيه سنايدر أن الخلايا الجذعية التي تمّ وضعها داخل الدماغ يمكن أن تتأثر بالوسط الدماغي بحيث تتمايز إلى العصبونات والخلايا الداعمة كليهما. لقد تصوّر الباحث المذكور أنه سيأتي يوم توضع فيه الخلايا الجذعية داخل الأدمغة المصابة بداء باركنسون وسوف يُترك للدماغ أمر إخبارها لأي نوع من الخلايا سوف تتمايز.

وحتى لو تبيَّن فيما بعد أن الأمر ليس تماماً بالبساطة التي ذُكرت آنفاً، فإن داء باركنسون، من حيث إمكانية علاجه بالاستبدال الخلوي، يطرح تحدياً أقل كثيراً في تثبيطه للهمم من اضطرابات عصبية أخرى. وكما يقول الباحث إساكسون: "تُعدّ منظومة عمل الدوبامين، إلى حدٍّ ما، منظومة يسهل العمل معها بالمقارنة مع منظومات حسّية - حركية، أو منظومات بصرية، أو أخرى خاصة بالنخاع الشوكي. وكما يفيد الباحث المذكور أيضاً، فإن هذا الأمر عائد إلى أن العصبونات السوداء المفقودة في داء باركنسون تتمتع، في مناطق من الدماغ، بوسائل ارتباط منتشرة وغير نوعية نسبياً تربطها مع هذه المناطق، وذلك عوضاً عن وسائل ارتباط دقيقة ومعقّدة جداً تحدثها عصبونات في أجزاء عديدة أخرى من الجهاز العصبي.

ومن المحتمل أن يتطلّب معظم الاضطرابات الدماغية الأخرى تحريض عصبونات جديدة كي تُحدِث وسائل ارتباط دقيقة جداً، وهو نوع من العمل ليس لأحد التأكّد من كيفية تحقيقه. غير أنه تبيَّن ببساطة، في حالة داء باركنسون، أن حث العصبونات على تحرير الدوبامين في المنطقة العامة الصحيحة من الدماغ سيساعد المرضى المصابين بهذا الداء. ونتيجة لذلك الاختلاف، يتنبأ إساكسون قائلاً: "سيستغرق الأمر بعض الوقت لجعل أمراض أخرى تستفيد من جميع هذه المكتشفات". ومع ذلك، فإن معالجة ناجحة لداء باركنسون معتمدة أساساً على الخلايا الجذعية ستظلّ تشكّل إنجازاً مثيراً. وفي السياق ذاته، يضيف الباحث إساكسون قائلاً: "سوف تتمكن من مساعدة عدد ضخم من المرضى وبالقدر الذي يستطيع الجرّاحون إنجازه".■

4- فأر أحادي النّسيلة؟*

إن إحدى تقانات استخدام الازدراع النووي أو الاستنسال هي توليد نسج ملائمة جينياً لمعالجة المرضى البالغين. ولكن يوجد جدل حول فيما إذا كانت الخلايا البالغة الراشدة مصدراً جيداً للنوى.

وراء كلّ الاحتجاجات حول استنسال الحيوانات وإمكانيات استنسال البشر يبقى بعض المشكلات العلمية المهمّة. فمثلاً، هل يمكن إعادة برمجة نواة الخلية البالغة المتخصّصة إلى أبعد الحدود بصورة كاملة، وبذلك يمكن توجيه تطوّر كامل الجنين الجديد؟ أو هل توجد مجموعات من الخلايا في المتعضيات البالغة - ربّما تمثّل الخلايا غير المتخصّصة المعروفة باسم الخلايا الجذعية - التي يمكن أن تتكيّف بسهولة أكثر؟ عالج كلٌّ من هوشدلينجر Hochedlinger وجانيش Jaenisch [1] المسألة، وادّعيا نجاحهما في إنتاج فئران مستنسلة باستخدام نوى من خلايا T أو B الناضجة. أعطت النتائج برهاناً قوياً على أنّ نواة الخلية المتمايزة يمكن أن تعيد في الواقع برمجتهما.

مع وجود كلّ الدعاية الحالية ، قد يبدو غريباً أنّ التوجّه المستخدم الأكثر شيوعاً للاستنسال - "نقل نووي لخلية جسمية somatic-cell nuclear transfer" - كان قد تطوّر في الواقع قبل نحو 40 سنة مضت في البرمائيات فقط لمعالجة أمثال هذه المسائل الأساسية. تتضمّن التقنية إحلال نواة خلية أكثر تخصّصاً من جنين أو بالغ محلّ نواة بويضة. والفكرة هي أنّ سيتوبلازما البويضة تُعيد بصورة ما برمجة النواة إلى حدٍّ تصبح فيه قابلة للتوجيه من الناحية التطوّرية، مثل البويضة الملقّحة، وقادرة على قيادة تشكيل كلّ النسج التي تصنع متعضية - التي ستكون طبعاً مماثلة من الناحية الجينية للخلية الأصلية.

بيّنت هذه التجارب المبكّرة أنّ نوى خلايا البرمائي المتمايزة من الناحية الشكلية، مثل الخلايا الظهارية المعوية [3] أو خلايا الجلد البالغ [3] للشرغوف، يمكن أن تولّد شراغيف مستنسلة. غير أنّ معدّل النجاح كان منخفضاً ولم يجرِ إنتاج ضفدع بالغ على الإطلاق من نواة خلية بالغة. وبصورة مغايرة، بيّنت تجارب أُحدثت على الثدييّات أنّه يمكن لنواة خلية بالغة أن تنتج نسائل قابلة للحياة [4، 5]. ولكن القليل جداً الذي تمّ الحصول عليه من دُرّية مولودة حية live-born كان من المحتمل أنه لم يأتِ من خلايا بالغة، وإنّما من خلايا بالغة نادرة أقلّ تخصّصاً مثل الخلايا الجذعية.

وهكذا، هل يمكن أن تُعاد برمجة خلايا بالغة متمايزة جداً؟ لاكتشاف ذلك يتطلّب الأمر علامة قابلة للتوريث والتي يمكن منها بوضوح تحديد هوية النسائل المشتقة من خلية متمايزة مفترضة. ففي الثدييّات، تكون الخلايا اللمفاوية في المنظومة المناعية مثالية لمثل هذا التحليل. فالخلايا اللمفاوية B هي خلايا تنتج جزيئات ضدية منحلة (غلوبولين مناعي) استجابة إلى المستضدات (مثل الفيروسات والبكتريات). الغلوبولينات المناعية مكوّنة من مجال نشاط متغيّر يتعرّف المستضدات، ومجال نشاط ثابت يحرّض استجابات مناعية. ويرمّز الجينوم مجالات نشاط متغيّرة بصورة كافية للاستجابة إلى نمطٍ من المستضد. ولكنّ كلّ خلية من خلايا B الناضجة تُنتج فقط نمطاً واحداً من الضد تتيح له الاستجابة إلى مستضدٍ واحدٍ. وللوصول إلى "عملية أحادية النسيلة" تقوم الخلية بإعادة ترتيب الدنا الخاص بها لدمج مجال النشاط

* نشر هذا الخبر في مجلة *Nature*,Vol 415, 28 February 2002. ترجمة هيئة التحرير - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

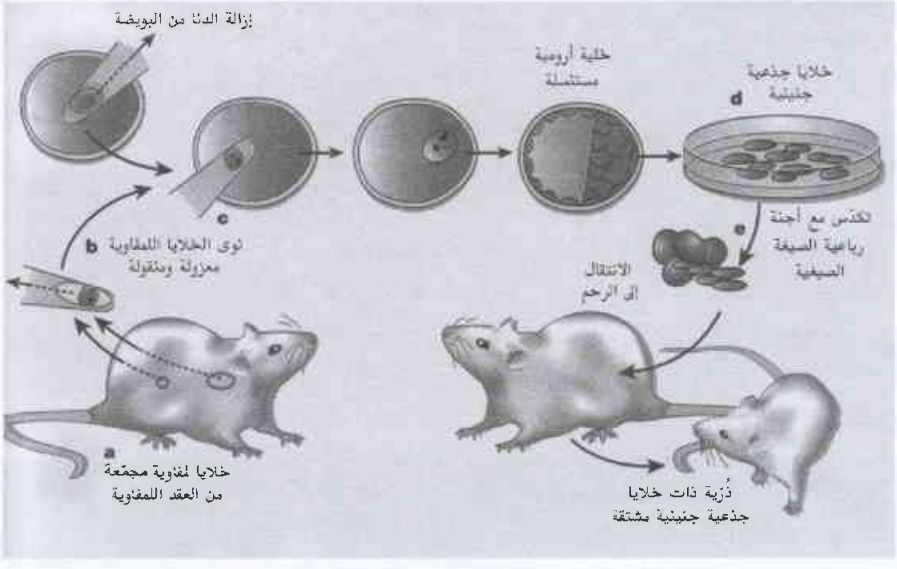
المتغيّر المختار بمجال النشاط الثابت. وبصورة مشابهة، تستجيب خلايا T اللمفاوية إلى المستضدات عبر معقّدها المستقبل - المستضد؛ وهذا يُعاد ترتيبه أيضاً في مستوى الجينوم، وبذلك فإنّ كلّ خلية T تعبّر عن نمطٍ واحدٍ من المستقبل.

ولذلك، فإنّ الخلايا B و T هي أمثلة نادرة من الخلايا التي يتغيّر فيها تسلسل الجينوم مع تقدّم نضجها. وهكذا، إذا كنتَ تستخدم الدنا من خلية B أو من خلية T للاستنسال بالنقل النووي ينبغي التحرّي عن إعادة الترتيب الجينومي في جميع خلايا النسائل.

ومع الأسف، يبدو أنّ نوى الخلايا اللمفاوية لا تستجيب بالأحرى إلى عملية إعادة البرمجة النووية. ففي دراسة هوشدلينجر وجانيش [1]، كان الاحتمال للوصول بجنين الفأر المستنسل إلى مرحلة الخلية الأرومية مانسبته فقط 4%. وللإحاطة بهذا الأمر، ولّد المؤلفون خلايا جذعية جنينية (ES) من خلايا أرومية مستنسلة، واستخدموا تقنية سُمّيت "تتميم الصيغة الصبغية الرباعية [6] لإنتاج فئران من سلالات الخلية الجذعية الجنينية (الشكل 1). فقد ولّدوا سلالتين: "LN1" تتمتع بإعادة ترتيب غلوبولين مناعي جيني، في حين تُظهر سلالة "LN2" إعادة ترتيب جينة الخلية T المستقبلة- المستضدة. وهكذا اشتُقت LN1 من نواة خلية B اللمفاوية و LN2 من نواة الخلية T. ولّد هوشدلينجر وجانيش، من السلالة LN1، فئراناً حية لها جينات غلوبولين مناعي أُعيد ترتيبها في جميع النسج. في حين لم تُفض السلالة LN2 إلى أي فأرة حية، رغم ولادة جنينٍ واحدٍ ميت في موعده، وبيّنت تجربة منفصلة أنّ خلايا جذعية جنينية من السلالة LN2 يمكن أن تساهم في نسج متعدّدة، تتضمّن المنظومة المناعية، عندما تندمج مع خلايا وحشية النمط في الكائنات المحوّرة جينياً.

وهكذا، هل حسمت هذه التجربة مسألة فيما إذا كان بإمكان النوى من خلايا بالغة متمايزة كلّياً أن تُعيد برمجتها لتسمح بنمو عادي؟ إنّ الدليل على ذلك مقنع، رغم أنّ التقليديين يقولون العكس. إنّ استخدام متوسطات بين الخلايا الجذعية الجنينية ربما أجاز الوقت لإعادة برمجة إضافية. وبالإضافة إلى ذلك، قُصد من استخدام نهج تتميم الصيغة الصبغية الرباعية أنّ المؤلّفين لم يتمكّنوا من تقييم فيما إذا كان بالإمكان أن تحدث إعادة البرمجة النووية الصحيحة في النسج المشيمية (انظر الشكل1). بالنظر إلى أنّ مشكلات المشيمة هي من أحد العيوب الأكثر تكرّراً في الثديّات المستنسلة، فهذا شأن صحيح. وأخيراً، إنّ عدد الذُّرّية المستنسلة الحية المنتجة بعدد من الانتقالات النووية كان صغيراً جداً، يقترب من واحد بالألف. وهكذا، نحن ما نزال مندهشين فيما إذا كان بإمكان نوى الخلايا المتمايزة أن تُعيد برمجتها في النهاية تحت ظروف استثنائية.

لماذا تختلف النوى من النسج البالغة المختلفة في الفعّالية التي يمكن بها أن تُعيد برمجتها؟ هل يمكن أن تكون ناجمة عن احتواء أو عدم احتواء النسج على خلايا جذعية؟ هذا أمر لابد من اكتشافه. إن فكرة أنّ نوى الخلايا الجذعية يمكن أن تجري فيها إعادة البرمجة بصورة أسهل، جاءت من استخدام الخلايا الجذعية الجنينية - التي تكون متعدّدة التطبيقات من حيث النمو أكثر من الخلايا الجذعية البالغة - كمصدر للخلايا من أجل النقل النووي [7، 8]. بيّنت هذه الدراسات أنّ خلايا أرومية أكثر تطوّرت إلى مرحلة من الولادة الحية عندما كان مصدر النوى من الخلايا الجذعية الجنينية وليس من الخلايا البالغة. ولكنّ وصول عدد قليل من الأجنّة المنتجة من نوى الخلايا الجذعية الجنينية إلى مرحلة الخلايا الأرومية يعني أنّ النسب الكلّية للذُّرّيات الحية بالنقل النووي لم تكن مختلفة جداً. وإحدى المشكلات مع النسائل المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية هي أنّ التعبير عنها بالجينات "المدموغة" - وهي جينات تكون معبّرة بصورة خاصة عن صبغي مشتق من الأم أو من الأب وليس من كليهما، يكون غالباً شاذّاً. وبالمقابل، فإنّ دراسة [9] فئران مستنسلة مشتقة من نوى خلايا بالغة بيّنت أنّ جينات "مدموغة" متعدّدة كانت تعبّر عن نفسها بصورة



الشكل 1- تقنية هوشدلينجر وجانيش [1] لتوليد فئران مستنسلة، باستخدام نوى من خلايا مناعية ناضجة. a، عُزلت خلايا لمفاوية من العقد اللمفاوية التي تتألّف تقريباً بكاملها من خلايا لمفاوية B و T ناضجة. تُبيّن هذه الخلايا إعادة ترتيب غلوبولين مناعي أو جينات خلية T المستقبلة - المستضدة على التوالي، في حين تتمتع النسج الأخرى في الجسم بجينات غير معادة الترتيب. b، استُخلصت نوى من خلايا B أو T، و c، نقلت هذه النوى، إلى بيوض فأرة مسلوبة النوى ومستنبتة إلى مرحلة الخلية الأرومية من النمو. d، ولّدت بعد ذلك خلايا جذعية جنينية من الخلايا الأرومية المستنسلة وكُدّست بأجنّة رباعية الصيغة الصبغية. e، جرى توليدها بالاندماج الكهربائي لأجنّة من ذوات الخليتين. وهذا ما أدّى إلى إنتاج كائنات محوّرة جينياً، حيث يكون الجنين الكامل مشتقاً من خلايا جذعية جنينية، في حين تكون النبى المشيمية مزوّدة بخلايا رباعية الصيغة الصبغية. والذُّرّية الناتجة تكون بكاملها مشتقة من خلايا جذعية جنينية، وإذا تمت من انتقال ناجح لنواة لمفاوية B أو T، ستُظهر عمليات إعادة ترتيب جينية مناسبة في جميع النسج.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

عادية. وهكذا، يجب أن يكون اختيار الخلايا الجذعية من نسج جنينية أو بالغة [10، 11] أفضل من الخلايا الجذعية الجنينية لاختبار احتمال إعادة برمجة نوى الخلايا الجذعية.

يكون لهذه المسائل أهمية أساسية، ولكن لها طبعاً تطبيقات عملية . إنّ إحدى فوائد الاستنسال هي معالجة أمراض البشر؛ والفكرة هي استخدام بعض نوى المريض لإنتاج أجنّة مبكرة مماثلة من الناحية الجينية، التي منها تُولَّد خلايا جذعية جنينية وتُستخدم لتنمية نسج استبدال صحية في الزجاج. وما لم يحصل تقدّم حقيقي في إيجاد مصدر لنوى بالغة والتي بإمكانها، بصورة فعّالة، أن تعيد برمجتها، فإنّ كلّ ما تكلّمنا عنه بشأن الاستنسال العلاجي سينتهي إلى لاشيء. فآخر ما تمّ التوصّل إليه من دراسات [12] على الفئران تمثّل في توليد 35 سلالة من الخلايا الجذعية الجنينية من أكثر من ألف نقل نووي (بمردود 3.4%). وهذا سوف لا يكون مقبولاً في البشر، حيث سيصعب إيجاد البويضات. وربّما يبدو أنّ إعادة برمجة خلايا بالغة بصورة مباشرة، بدون مرحلة الخلية البويضية المتوسطة هي خيار قابل للتطبيق. بالتأكيد حان الوقت ليحوّل المتخصّصون في الاستنسال انتباههم إلى الآليات الجزيئية لإعادة البرمجة النووية في البويضة، وإلى استخدام المعلومات لتحسين إمكانية الخلايا البالغة لاستخدامها في المداواة المعتمدة على الخلايا.

المراجع REFERENCES

[1] Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. Nature 415, 1035-1038 (2002); online 10 February 2002 (10.1038/nature 718).

[2] Gurdon, J. B. J. Embryol. Exp. Morphol. 10, 622-640 (1962).

[3] Gurdon, J. B. & Laskey, R. A. J. Embryol. Exp. Morphol. 24, 227-248 (1970).

[4] Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Nature 385, 810-813 (1997).

[5] Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson. K. R. & Yanagimachi, R. Nature 394, 369-374 (1998).

[6] Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90, 8424-8428 (1993).

[7] Humpherys, D. et al. Science 293, 95-97 (2001).

[8] Rideout, W. M. III et al. Nature Genet. 24, 109-110 (2000).

[9] Inoue, K. et al. Science 295, 297 (2002).

[10] Goodell, M. A. et al. Nature Med. 3, 1337-1345 (1997).

[11] Toma, J. G. et al. Nature Cell Biol. 3, 778- 784 (2001).

[12] Wakayama, T. et al. Science 292, 740 - 743 (2001).■

5- استخدام تسميات غير مناسبة يجعل باحثاً في الخلايا الجذعية في مأزق*

إذا سبق لك أن وجدت نفسك مدعواً من الهيئة المخبرية لتشهد على موضوع مثار خلاف، تجد أن هنالك مقولة تحذيرية مفادها: باحث بارز في الخلية الجذعية سيتغلّب هذا الأسبوع على جراحه بعد اتهامه بتضليل الجمهور الأسترالي فيما يتعلّق بإمكانية نجاح بحث الخلايا الجذعية الجنينية.

آلان ترونسون A. Trounson، الذي يدير أحد مراكز البيولوجيا التطوّرية في جامعة موناش في ملبورن، انتُقِد في الأوساط الإعلامية بشكلٍ كبير بسبب عدم الدقة الفنية أثناء إعطاء المعلومات الدقيقة لأعضاء البرلمان. والتف خصوم البحث على الخطأ متخذين منه دليلاً على أن العلماء كانوا يسيئون عرض نتائجهم بشكلٍ متعمد.

يقول ترونسون المنهك جسدياً ومعنوياً، والذي نُقل إلى المشفى بسبب أزمة قلبية: "بصفتي عالماً تعرّضت سلامته للخطر من قِبَل أناس لأسباب شخصية، فإن هذا كان مرعباً بالنسبة لي، وكان أثره على أسرتي سيئاً جداً".

أثبت ترونسون للبرلمانيين، من خلال شريط فيديو، عملية شفاء جرذ مشلول بعد حقنه بما أسماه بالخلايا الجذعية الجنينية البشرية. لكنّ الخلايا كانت خلايا جرثومية جنينية؛ وبدقة أكبر، خلايا مأخوذة من أجزاء المضغات والأجنّة بعمر 5-9 أسابيع والتي تتشكّل منها فيما بعد البويضات والنطاف. تُشتق الخلايا الجذعية الجنينية من المضغات التي لايتجاوز عمرها بضعة أيام. وصوّر شريط الفيديو في مختبر جون غيرهارت، وهو بيولوجي في جامعة جونز هوبكنز، في بالتيمور، إلّا أن نتائج التجربة لم تصدر حتى الآن.

ومع أن ترونسون يدرك الخطأ، لكنّه يدافع عن أعماله، إذ يقول: إن الخلايا الجرثومية الجنينية لم يتم توضيحها لهؤلاء البرلمانيين من قبل، لذلك قمتُ بتبسيطها وأطلقتُ عليها اسم الخلايا الجذعية الجنينية، وهذه ليست تسمية دقيقة، لكنّها خلايا جنينية وجذعية ولايمكنك معرفة الفرق بينهما".

وقد أيّد العديد من البيولوجيين دفاع ترونسون، لكنّه ينصح الآخرين أن يكونوا حذرين عند تقديم معلومات للسياسيين، إذ يقول: "كونوا حذرين جداً عند تناول هذه المسائل مقدّماً مالم تكن هنالك مؤسسة احترافية تساعدكم، فيما يتعلّق بالتعامل مع الأوساط الإعلامية والسياسية، إذ لايمكنكم القيام بذلك بأنفسكم".

وتتطلّع أستراليا حالياً إلى إصدار تشريعات لتنظيم الاستنساخ البشري وأبحاث الخلية الجذعية. وفي الأسبوع الفائت، صوّت البرلمان على تجاوز الحظر الشامل على الاستنساخ البشري وإرجاء التصويت على بحوث الخلايا الجنينية حتى وقت لاحق من هذا الشهر.■

* نُشر هذا الخبر في مجلة *Nature*,Vol 419, 5 September 2002. ترجمة مكتب الترجمة والتأليف والنشر - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

6- أوربة تواجه تحدّي البحث في الخلايا الجذعية الجنينية*

قادت التعدّدية التاريخية الأوربية وفقدان تعريف مقبول بصورة عامة للوضعية القانونية للجنين إلى تنظيمات مختلفة في البلدان الأوربية. إنّ تشريع المجلس الأوربي والاتحاد الأوربي، المستند على مبادئ أخلاقية أساسية موجود بالفعل من أجل مشكلات نوعية مثل منع إنتاج أجنّة فقط من أجل البحث. إنّ مثل هذه المبادئ وضّحتها حديثاً المجموعة الأوربية لأخلاقيات العلوم والتقانات الجديدة. بدأت تقنيات بحث برزت حديثاً بإثارة إعادة النظر في تنظيمات البحث في الأجنّة في أوربة.

هل يُحدِث استنبات خلايا جذعية جنينية بشرية حقاً ثورة طبية؟ هل سيقود ذلك نحو طريقة جديدة تماماً في الطب الممارَس، حيث يمكن إعادة توليد أجزاء مريضة من الجسم البشري بطعوم grafts مشتقة من خلايا متمايزة؟ هل هذا الطب الجديد من "إعادة التوليد" يساعد المجتمع على إزالة تغيّرات أحداث اليانصيب الوراثية الطبيعية لكلّ فردٍ قادرٍ على استعمال خلاياه أو خلاياها المستنبتة كمصدر لنسج وأعضاء جديدة؟

بالطبع لا أحد يعرف. ومع ذلك، فإنّ العمل على الخلايا الجذعية الجنينية، الواردة في مجلة العلوم أواخر عام 1998 [1]، قد أحدث آمالاً غير مسبوقة، والنتيجة المباشرة كانت انعكاساً جديداً على الوضع الشرعي للجنين البشري. ومثل هذا الانعكاس يتطلّب التوفيق بين احترام حياة البشر وبين حرّية الاستعلام، وهي مبادئ لها أرضيات دستورية في أوربة [2].

إن شرعية الجنين البشري خلال تاريخ البشرية تغيّرت باستمرار استجابة لتغيّر القيم الثقافية واكتساب المعارف العلمية الجديدة. فبالنسبة إلى فلاسفة اليونان القدماء، على سبيل المثال، لم تكن لحياة البشر بذاتها أية قيمة. وبحسب أرسطو، فقد قُدِّر أنّ الجنين يستحق الحماية فقط بعد 40 يوماً للذكور و 90 يوماً للإناث. والكنيسة الكاثوليكية لم تُدِن الإجهاض فوراً. ففي القرن الخامس بعد الميلاد اعتقد سانت أوغستين S. Augustine أن الجنين هو جزء من جسم المرأة وأنّه لذلك مجرّدٌ من أي إحساس خاص به [3]. لقد أدين الإجهاض فقط في القرن الثالث عشر من قِبَل الكنيسة على أنّه مضاد للطبيعة ومضاد لمهمّة المرأة لحمل الأطفال. إنّ كلّ الأديان الرئيسة الموحّدة، اليهودية والكاثوليكية والبروتستانتية والإسلام، بقيت منقسمة على نفسها فيما يتعلّق بشرعية جنين الإنسان [4].

ففي أوربة، الأكثر لا دينية في الوقت الحاضر، يستمر الخلاف بين أولئك الذين يعتقدون أنّ جنين الإنسان يجب أن يُحترم كشخص وأولئك الذين يعتقدون أنّه مجرّد بيضة ملقّحة بصورة أساسية. ومع ذلك، فإنّ مبدأ احترام حياة الإنسان تجذّر بقوة في التقاليد الأوربية، وهكذا جرى التشكيك في الغالب بادّعاء الجنس البشري بالسيادة المطلقة على الكون. وهذا مُلاحظ في ألمانية، حيث إن الدين والالتزام العميق لاحترام الإجراءات الطبيعية، المرتبطين بالحاجة إلى رفض تدهور حياة البشر في النظام الهتلري يسهمان في المنع الحازم لأبحاث الجنين [5].

يجب أن تؤخذ التعددية الأوربية بالحسبان في فهم شرعية أبحاث الجنين وفي توقّع تطوّرها في المستقبل. وحتى الآن، اتخذت البلدان الأوربية المختلفة توجّهات متباينة ليس فقط تجاه أبحاث الأجنّة ولكن أيضاً تجاه موضوعات أخرى مثل الإجهاض وتقانات التكاثر الجديدة. ومن ناحية أخرى، يوجد التشريع الأوربي الموحّد في موضوعات نوعية نذكر منها: المنع ضد توليد أجنّة فقط لأهداف بحثية وضد أي استثمار تجاري، ومنع استنسال تكاثري وتحوير الخط الجرثومي الأصلي البشري germ line البشري. ورغم ذلك، يبدو أنّ بعض نقاط الاتفاق المذكورة تكون عرضة للانتقاد نظراً للتعقيد الناجم عن البحث في الخلايا الجذعية الجنينية. والمعيار بين البلدان الأوربية كان في دعم مبدأ احترام الإنسان من البدايات الأولى للحياة، وحتى قبل الولادة. وهذا لا يعني أنّ حق الحياة قد جرى تعرّفه بصورة آلية في حالة الطفل قبل الولادة. فقد قرّرت المحكمة الدستورية النمساوية، مثلاً، أنّ حق الحياة "لا يمكن تطبيقه على الجنين" [6]، في حين حكمت المحكمة الدستورية الألمانية عكس ذلك إذ أنّ جنين الإنسان يتمتّع بكامل منزلة الإنسان [7]. وهذا ما أفضى إلى اختلاف كبير في التشريع في أوربة فيما يتعلّق بالإجهاض، فهو يتخذ موقعاً مختلفاً بحسب البلدان. ففي إيرلندة، حيث الدستور يشترع "حق الحياة للطفل قبل الولادة" ويُفضي إلى منع حاسم ضد الإجهاض، في حين أن الإجهاض في فرنسة والمملكة المتحدة مسموح به بصورة عامة حتى الأسبوع العاشر أو الثاني عشر من الحمل.

وتوجد درجات خلاف مماثلة في التشريع الوطني في أوربة في التعامل مع أبحاث الجنين. فمثلاً في فرنسة، رغم أنّ حقوق الإجهاض متسامحة والتلقيح في الزجاج (في الأنابيب) يجري بصورة عامة، فإنّ أبحاث الأجنّة ممنوعة قانونياً. وبالإضافة إلى ذلك، ورغم أنّ كلّ بلد من البلدان الأعضاء في الاتحاد الأوربي له تشريع حول الإجهاض، هنالك 7 دول من أصل 15 دولة من هذه الدول لها تدابير قانونية فيما يتعلّق بأبحاث الجنين [8]. فالمملكة المتحدة التي هي في صدر الأبحاث سنّت قوانين متحرّرة جداً لتشجيع أبحاث الجنين، في حين تركتها بلجيكة غير منظّمة. إنّ أي بلدٍ من البلدان الأوربية لم يتجاسر حتى الآن لتعريف الجنين البشري أو مفهوم حياة الإنسان. وهكذا يبدو أنّ المشرّعين يشعرون بعدم قدرتهم على

* نُشر هذا الخبر في مجلة *Science*, Vol. 287, 25 February. 2000. ترجمة هيئة التحرير - هيئة الطاقة الذرّية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

تثبيت تسميات واضحة مثل المفاهيم التي لا يمكن أن تكون إلّا مفاهيم اعتباطية. عُرِّفت الحدود بين الحياة والموت، في الحقيقة، بحسب التقاليد الاجتماعية. وهذا جرى توضيحه حديثاً بالتسليم بموت الدماغ كحدثٍ حاسم من الناحية القانونية. ويرتبط هذا المعيار القانوني الجديد مع عملية جني أعضاء للازدراع. وبصورة مماثلة، جرى تطوير مفهوم "ما قبل الجنين pre-embryo" (لعمر أقلّ من 14 يوماً بعد اتحاد الأعراس [9]) لتلطيف الجدل المتعلّق بأبحاث الجنين.

فهل هذا يعني أنّ تعريف مثل هذه المفاهيم الأساسية، كحياة الإنسان، مرتبط ليكون مستنداً إلى مبادئ هشّة؟ في أوربة، يكون الجواب قطعاً بالنفي. رغم أنّ كل بلد أوربي هو الذي يقرّر شرعية أبحاث الجنين، إلّا أنه في تلك البلدان التي تسمح بهذه الأبحاث، يجب تنفيذها طبقاً لتنظيمات موضوعة من قبل السلطات الأوربية، أي المجلس الأوربي (وهي منظّمة تجمع بلدان أوربة الغربية والشرقية) [10] والاتحاد الأوربي. ومع ذلك، فإنّ بعض هذه التنظيمات تظهر الآن متناقضة في إطار إنتاج الخلايا الجذعية الجنينية المحتمل.

والتنظيم الأول هو الاتفاقية "حول حقوق البشر والطب الحيوي" للمجلس الأوربي، والنافذة المفعول بتاريخ 1 كانون الأول عام [11] 1999. كما ذكرنا، ورغم أنّها تترك لكلّ بلد القرار بسماح أبحاث الجنين أو منعها، فإنّها تطلب، مع ذلك، من البلدان أن تمنع "خلق أجنّة البشر لأهداف بحثية". ويبدو ذلك معقولاً حتى الآن لأن أبحاث الجنين ارتبطت بصورة رئيسة مع تقانات التوالد (التكاثر) الجديدة، وكان الباحثون قادرين على القيام بتجارب على أجنّة فائقة العدد. فهل هذا الحظر ينسجم مع البحث في الخلايا الجذعية الجنينية المتولّدة بطرائق النقل النووي؟ على ما يبدو أنّ الجواب هو لا، ومن المحتمل أنّه أحد الأسباب التي تؤدّي إلى تردّد بعض البلدان الأوربية للمصادقة على الاتفاقية. فعلى مستوى الاتحاد الأوربي، إنّ التنظيم "حول الحماية القانونية للمخترعات التقانية الحيوية" المؤرّخ في 12 تموز عام 1998 [12] يعتبر "استخدام الأجنّة لأهداف صناعية وتجارية" مجرد اختراعات غير قابلة للترخيص. فهل هذا الحظر العائد إلى المبدأ الأوربي الأقدم "رفض الاستثمار التجاري لجسم الإنسان" يتوافق مع ترخيص الخلايا الجذعية المستنبتة؟ وهذه مسألة أخرى أُثيرت الآن.

والشيء الناقص هو توضيح المعايير الأوربية عند المراهنة في هذا المجال. إنّها فجوة سَعَتْ المجموعة الأوربية لأخلاقيات العلوم والتقانات (EGE) لملئها بصدف الفتاوى البالغة 14 فتوى حتى الآن فيما يتعلّق بأخلاقيات أبحاث الأجنّة [8]. إنّ المجموعة الأوربية للأخلاقيات، التي أُحدثت في عام 1991، هي لجنة استشارية للمفوضية الأوربية والبرلمان الأوربي ومجلس وزراء الاتحاد الأوربي وهي مجموعة مستقلة ممثّلة باثني عشر بلداً ومجالات دراسة متعددة (الفلسفة والقانون والطب وعلوم الحياة وعلم الاجتماع وعلم الأديان والعلوم الحاسوبية) [8].

أخذت المجموعة الأوربية للأخلاقيات بالحسبان حقيقة عدم وجود تنظيم محدّد على مستوى الاتحاد الأوربي يتعلّق باستنبات الخلايا الجذعية الجنينية وعدم وجود رغبة حقيقية لتنسيق القوانين الوطنية وتعترف المجموعة الأوربية للأخلاقيات في فتواها المتعلّقة بأبحاث الجنين أنّه بسبب فقدان الإجماع المتعلّق بالوضعية القانونية لأجنّة الإنسان، قد يكون من غير المناسب فرض كود أخلاقي محدّد واحد". ووفقاً لذلك، رفضت المجموعة الأوربية للأخلاقيات الدعوة إلى منع تمويل عام لأبحاث الجنين في مستوى المجموعة الأوربية، بالمقابل، وبالنسبة إلى الولايات المتحدة، فقد منع الكونغرس تمويلاً فدرالياً لأبحاث الجنين تاركاً التمويل لجهات خاصة. فقد أصرّت المجموعة الأوربية لأخلاقيات العلوم والتقانات على أنّه "من المهم وضع أبحاث جنين الإنسان، في البلدان التي سمحت بها، تحت مراقبة حكومية صارمة، في حين يجري ضمان وضوح أقصى سواء نُفّذت الأبحاث قيد الدرس بالقطاع العام أو الخاص.

في هذا الإطار يكون مبدأ كرامة الإنسان في أوربة أقوى من مبدأ حرية البحث غير المحدودة . وهذا ما يفسّر سبب التحريم العام على المستوى الأوربي للاستنسال التوالدي (التكاثري) وتحويلات الخط الجرثومي البشري الأصلي، سواء في التنظيم المذكور آنفاً "حول الحماية القانونية للاختراعات التقانية الحيوية"، أم في قرار الاتحاد الأوربي برفض تمويل مثل هذا البحث [13]. والمشكلة هنا تكمن في أنّ مداولة الجنين يثير قلقاً أخلاقياً مختلفاً تماماً يعتمد على ما إذا كان موجهاً للبحث أو إلى الإنسال. وكما ذكرت المجموعة الأوربية لأخلاقيات العلوم والتقانات في فتاواها عن الاستنسال: "إن اعتبارات استخدام الآلات ومبحث تحسين النسل eugenics تجعل الاستنسال التوالدي غير مقبول من الناحية الأخلاقية"، ولكنّ الحال ليس كذلك من أجل البحث في الجنين البشري، رغم حقيقة أنّ مثل هذا البحث يثير من ناحية أخرى "خلافات أخلاقية خطيرة" [8].

ثانياً، هناك ضرر يتعذّر إلغاؤه ما لم يوضع توكيد قوي على مبدأ التحذير الملائم في طليعة السعي وراء الاهتمامات الاقتصادية. ونتيجة لذلك يجب أن يأتي التقييم الأخلاقي ومناقشة الجمهور المفتوحة قبل البحث في معظم المجالات الخلافية. والشيء الأساسي في المناقشة إعطاء الإمكانية لاستخدام الخلايا الجذعية الجنينية في المجال الصناعي. وتصرّ المجموعة الأوربية لأخلاقيات العلوم والتقانات على أنه: مهما يُنتظر من الاحتمالات الطبية الواعدة في المستقبل، تثير المداولات الحديثة لسلالات الخلايا الجذعية الجنينية المنجزة في الولايات المتحدة عدداً من القضايا الأخلاقية، وهذه القضايا تؤكد على الإلحاح لتوسيع المناقشة .... والمواطنون الأوربيون لهم الحق في معرفة الحقائق ..... وأن يكونوا أيضاً في وضع لتقييم المسؤوليات المقترحة من أجل المجتمع ككلّ [8].

وفي الختام، إن البحث في الخلايا الجذعية الجنينية في أوربة سيعتمد في النهاية على تقييمات المواطنين الأوربيين. وكما قال رابليه Rabelais في عام 1532 في كتابه البانتاغرييل Pantagriel [14]: "العلم بدون الضمير ما هو إلّا موت الروح". في ضوء الانشغالات الكاملة في أوربة حالياً، يجب أن يُفهم هذا العرض كمنعكس لتيارين ثقافيين: أولاً، يتمسّك الأوربيون بفكرة مفادها أنّه ينبغي على السلطات الحكومية إقامة المبادئ وفقاً لأي بحث يجب أن يُدار. ثانياً، وبسبب خبرة (تجربة) الفرط العلمي الأوربي، هنالك إجماع على ضرورة انسجام البرنامج العلمي مع القيم الاجتماعية الأساسية.

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

المراجع REFERENCES

[1] E. Marshall, Science 282, 1014 (1998); Science 282, 1962 (1998).

[2] According to Article 2 of the European Convention for the Protection of Human Rights and Fundamental Freedoms, signed in Rome on 4 November 1950, "Everyone's right to life shall be protected by law..."

[3] J. T. Noonan Jr., Contraception, a History of Its Treatment by Catholic Theologians and Canonists (- Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1965).

[4] A. McLaren, A History of Contraception from Antiquity to the Present Day (Blackwell, Oxford, 1990).

[5] E. Deutsch, Med. Law 12, 535 (1993).

[6] Quoted by M. Knoppers in Human Dignity and Genetic Heritage (Reform Commission of Canada, study document in the "Protection of Life" series).

[7] Decision of the Constitutional German Federal Tribunal about the Abortion Act, 25 February 1975, Entscheidungen des Bundesverfassungsgerichts, Tome 39, p. 37.

[8] For more details, see Science Online (www.sciencemag.org/feature/data/1047249.shl).

[9] Article 3 of the UK Human Fertilisation and Embryology Act (Her Majesty's Stationery Office, London, 1990).

[10] The Council of Europe is an international organization established in the wake of the Second World War, whose main role is to strengthen democracy, human rights, and the rule of law throughout its member states. For further information, see (8).

[11] The Convention has been ratified by, and is thus applicable in, six countries: Denmark, Greece, San Marino, Slovakia, Slovenia, and Spain.

[12] Directive 98/44/EC of the European Parliament and of the Council of 6 July 1998 on the legal protection of biotechnological inventions (Official Journal of the European Communities, L 213, Vol. 41, 30 July 1998).

[13] Decision No. 182/ 1999/ EC of the European Parliament and of the Council, of 22 December 1998, concerning the Fifth Framework Program of the European Community for "Research, Technological to 2002) (Official Journal of the European Communities, L 26/1, 1 February 1999).

[14] F. Rabelais, Gargantua and Pantagruel, B. Raffel, Transl. (Norton, New York, 1991).■

7- تنافس الخلايا الجذعية*

يستمر النقاش حول المزايا النسبية لاستخدام خلايا جذعية جنينية وخلايا جذعية بالغة في البحث - وربّما، يوماً ما، لمعالجة المرضى. وهناك بحثان جديدان يفحصان بعناية قدرات هذه الخلايا اللافتة للنظر.

في شهر آب من عام 2002 فَتَنَتْ خلايا صغيرة في علب بِتْري جماهير مشاهدي التلفاز. فقد ناقش أحد المسؤولين أخلاقية دراسة الخلايا الجذعية الجنينية (ES) ومخاطرها وإمكانياتها الطبية. تمثّل هذه الخلايا بالنسبة إلى المؤيّدين الأمل الكبير لمعالجة الاضطرابات المخرّبة مثل مرض باركنسون والداء السكري وإصابات النخاع الشوكي. أمّا بالنسبة إلى أولئك الذين يعارضون بشدة استخدام خلايا مشتقة من الأجنّة البشرية، فقد أوصوا بالخلايا الجذعية من البالغين كبديل معقول تجريبياً ومقبول أخلاقياً.

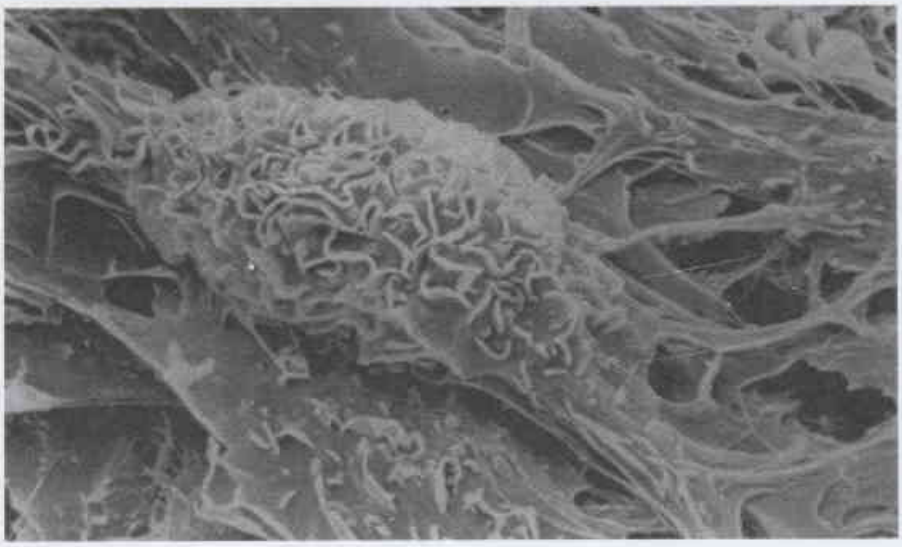
هناك بحثان في هذا الموضوع يثيران المناقشة من جديد. يصف كيم Kim وزملاؤه [1] كيف أنهم ولّدوا صنفاً محدّداً من العصبونات من خلايا جذعية جنينية مستنبتة لفأر، واستخدموا العصبونات لعكس أعراض مرض باركنسون في الجرذان. وبتعبير آخر، يمكن أن تولّد الخلايا الجذعية الجنينية أنماطاً من الخلايا المتخصّصة تكون فعّالة من الناحية العلاجية في الحيوانات. وفي غضون ذلك، اشتق جيانغ Jiang وزملاؤه [2] خلايا متعدّدة الوظائف ملفتة للنظر من مخ عظام أفراد بالغة من الفئران والجرذان والبشر. عزّزت هاتان الدراستان الأمل في هذه الخلايا الجذعية، حتى ولو أنّها تُذكي نار المناقشة حول فيما إذا كان من الواجب الحصول على مثل هذه الخلايا من أجنّة أو من بالغين.

تتمتع الخلايا الجذعية، التي تُعدّ الكتل البنائية الأساسية للمتعضيات كثيرات الخلايا، بخاصتين محدّدتين اثنتين: يمكنها إنتاج خلايا جذعية أكثر وتوليد أنماط من الخلايا المتخصّصة مثل الخلايا العصبية والدموية والكبدية. فهي تتّخذ ضروباً مختلفة من الوظائف بحسب زمن ومكان إنتاجها أثناء تناميها وكمّية الوظائف التي تحملها. تُنتج الخلايا الجذعية المتعدّدة الإمكانات كلّ أنماط الخلايا. وأفضلها تميّزاً هي الخلايا الجذعية الجنينية ES (الشكل 1)، التي تُشتق من أجنّة الفئران أو البشر. إن هذه الخلايا تتكاثر بصورة غير محدودة في المستنبت وتحافظ عملياً أثناء ذلك على إمكانية تمايز إلى أي نمط خلوي عند التحريض. هكذا، ومن حيث المبدأ، يجب أن تكون الخلايا الجذعية قادرة على توليد كمّيات من أية خلية مرغوبة لازدراعها في المرضى.

من الناحية النموذجية، تكون الخلايا الجذعية المأخوذة من أنسجة البالغين أو من أنسجة الأجنّة الأقدم عمراً، أكثر تقييداً في إمكانيتها على النمو وقابليتها للتكاثر. فمثلاً، تصنع الخلايا الجذعية المكوّنة للدم في الحي كلّ أنماط خلايا الدم، ولكنّها تكون أقلّ تكاثراً في المستنبت، وظُنّ أنها لا

* نُشر هذا الخبر في مجلة *Nature*, Vol. 418, 4 July. 2002. ترجمة هيئة التحرير - هيئة الطاقة الذرية السورية.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية



الشكل 1- خلية جذعية جنينية - العرض الذي شاهدته جماهير مشاهدي التلفاز.

تعطي خلايا لأنسجة أخرى. أثارت دراسات حديثة إمكانية أنّ بعض الخلايا الجذعية في البالغين يمكن أن تولّد خلايا خارج نسيجها الأصلي؛ ومع ذلك، فإن هذه النتائج مثيرة للجدل [3] وأثبتت في الغالب صعوبة في إعادة الحصول عليها [4]. ورغم ذلك، فإن أولئك الذين عارضوا استخدام الخلايا الجذعية الجنينية البشرية يعلنون عن إمكانية الخلايا الجذعية البالغة المتعدّدة الإمكانيات كطريقة لتنفيذ كسب طبي بدون انزعاج أخلاقي. ورغم أن الباحثين يولّدون خلايا جذعية جنينية من أجنّة قبل الازدراع في المستنبت، وأن بلاداً متعدّدة أجازت اشتقاق سلالات خلايا جذعية جنينية بشرية من أجنّة "فائضة" مولّدة عبر الإخصاب في الزجاج، فإن بعضهم يبقى غير مرتاح بإتلاف أجنّة البشر، حتى تلك الأجنّة التي لا يكون من المقرّر ازدراعها في الرحم.

وإلى جانب هذه المشكلات الأخلاقية، توجد عقبات تقنية في استعمال الخلايا الجذعية الجنينية. أولاً، يمكن الحصول على هذه الخلايا فقط من الأجنّة المبكرة جداً، ورغم تصنيع سلالات متعدّدة من الخلايا الجذعية الجنينية البشرية، فإنّها لا تكون ملائمة، من الناحية المناعية، لمعظم المرضى الذين يحتاجون إلى غرسات خلوية. وهكذا، سيحتاج الباحثون إمّا لاشتقاق الكثير من سلالات الخلايا الجذعية الجنينية، وإمّا لتصنيع خلايا جذعية جنينية على أساس كل مريض على حدة "باستنسال علاجي". وثانياً، تشكّل الخلايا الجذعية الجنينية أوراماً مسخية teratomas (وهي أورام حميدة تحتوي على خليط من أنماط نسيجية) بعد أن يجري ازدراعها. وهكذا، لا بدّ أن تكون الخلايا الجذعية الجنينية متمايزة بصورة موثوقة إلى نمط الخلية المناسب في المستنبت قبل عملية الازدراع.

وبالإضافة إلى ذلك، لم يُبرهن حتى الآن أنّ الخلايا المتخصّصة المشتقة من خلايا جذعية جنينية مستنبتة يمكن أن تؤدي وظيفة بالفعل ضمن النسج بعد عملية الازدراع [5، 6]. فمثلاً، تُنتج خلايا فأر جذعية جنينية خلايا مفرزة للأنسولين في المستنبت، غير أن مثل هذه الخلايا لم تُظهر أنّها تعكس سويات سكر الدم العالية في الفئران المصابة بأعراض داء السكري [6]. وربّما ليس مدهشاً أن الخلايا المولّدة في الزجاج قد لا تكون معادلة لتلك الخلايا التي نشأت في الحي مع التأثر الخلوي الواسع و"المعلومات education" التي تحدث أثناء التنامي. ولكنّ كيم Kim وزملاءه [1] تغلبوا الآن على المشكلة في أعمالهم على الجرذان المصابة بأعراض داء باركنسون البشري.

يعود سبب داء باركنسون إلى موت العصبونات الموجودة في المنطقة المخطّطة من الدماغ التي تُنتج الدوبامين الناقل لنبضات العصب عبر المشبك، وتؤثر في التحكّم بالحركات. لقد عولجت أعراض داء باركنسون بنجاح في الحيوانات بغرس عصبونات منتجة للدوبامين في الجسم المخطّط striatum ليحلّ محلّ العصبونات المفقودة. ومع ذلك، فقد كانت النتائج لدى البشر مختلفة [7]، والمشكلة الأساسية كانت ندرة العصبونات المناسبة. وهذه العصبونات ستكون غزيرة إذا أمكن إنتاجها من خلايا جذعية جنينية مستنبتة، غير أنّه ثبت أنّ هذا الأمر غير كافٍ ولم يكن مؤكداً فيما إذا كانت العصبونات الناتجة فعّالة.

وهنا ينضم كيم وزملاؤه [1] إلى الأمر ويذكر أنّه لتحسين مردود العصبونات المنتجة للدوبامين، استخلص المؤلفان بروتين نرل Nurrl protein، الذي يكون ضرورياً لتوليد هذه العصبونات في الحي، في الخلايا الجذعية الجنينية المستنبتة. بقيت الخلايا الناتجة على قيد الحياة بعد أن تمّ ازدراعها في الجرذان المصابة بأعراض داء باركنسون، وأبدت خواص فيزيولوجية كهربائية مناسبة. والشيء الأكثر إثارة هو أن الجرذان بدأت باستعادة الحركات العادية. ازدرع آخرون خلايا جذعية جنينية متمايزة جزئياً لتحسين أعراض داء باركنسون في الجرذان، ولكنهم لاحظوا أوراماً في بعض الحيوانات [8]. فقد توصّل كيم وزملاؤه، عن طريق الكشف عن الفعالية أثناء تجنّب تشكيل الورم، إلى إثبات المبدأ، رغم أن الخلايا الجذعية الجنينية التي حُوّرت جنينياً بهذه الطريقة غير مرغوب باستخدامها لدى البشر.

ولتجنّب مساوىء الخلايا الجذعية الجنينية، يجب - مثالياً - تعيين هوية خلية جذعية بالغة متعدّدة الإمكانات، حيث تتكاثر بصورة غير محدودة في المستنبت. وهذا ما فعله جيانغ وزملاؤه [2] تماماً على ما يبدو. أشار عمل سابق [9] إلى وجود جمهرة من الخلايا الجذعية في نقي العظم، تُعرف بالخلايا الجذعية اللُحمية المتوسّطة mesenchymal، التي يمكن أن تشكّل العضلات والغضاريف والعظام والدَسَم. وإذا أخذنا نهجاً مشابهاً، بدأ جيانغ وزملاؤه بخلايا غير مكوّنة لنقي العظم فاستنبتوها وعزلوا منها جمهرة أطلقوا عليها اسم خلايا مولّدة بالغة متعدّدة الإمكانات (MAPCs).

في المستنبت، تكاثرت خلية واحدة من الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات لفأر بصورة غير محدودة، وتمايزت إلى أنماط من خلايا متخصّصة متعدّدة. وعند حقنها في أجنّة فئران في مرحلة الخلية الأرومية، أسهمت الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات إلى أبعد الحدود في نمو النسج. وعندما حُقنت عن طريق الوريد في فأر بالغ، أعطت أنماطاً من

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

الخواص	الخلايا الجذعية الجنينية	الخلايا المولّدة البالغة متعددة الإمكانات
الأصل	جنين	نقي عظم بالغ
إمكانية النمو	غير محدد	غير محدد
التمايز إلى معظم أنماط الخلايا؟	نعم	نعم
عامل النمو المطلوب؟	نعم	نعم (من أجل بعض أنماط الخلايا المولّدة البالغة متعددة الإمكانات)
ثبات وحدة الصبغي	ثبات معقول	ثبات مرتفع
تعبير مشابه البروتين Oct-4	مرتفع	منخفض جداً
المساهمة بالخلايا الجرثومية؟	نعم	غير معروفة
إنتاج خلايا ورمية عند الانغراس؟	لا	نعم
عرض معاوضة الجرعة؟	لا	غير معروف
فعالية التحول الجيني	مرتفع	غير معروفة
إمكانية الانغراس الذاتي؟	لا	نعم

الشكل 2– مقارنة بين خلايا جذعية جنينية وخلايا مولّدة بالغة متعدّدة الإمكانات الموصوفة من قِبَل جيانغ وزملائه [2]. تحتاج الخلايا الجذعية الجنينية (والخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات في الفأر) لعامل LIF للنمو؛ في حين لا تحتاج إلى تلك الخلايا المستنبتة الأخرى، وهذه تبدو أنها سمة فريدة من سمات الخلايا الجذعية المتعدّدة الإمكانات. إن تعبير Oct-4 في الخلايا الجنينية الجذعية يتعلّق بتعدّد الوظيفة، فإذا كانت الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات مشابهة للخلايا الجذعية الجنينية، يمكن توقّع أن تعبير Oct-4 يكون متشابهاً. الخلايا الجرثومية هي البيوض أو النطاف. يعطّل تعويض الجرعات أحد الصبغيين X في الإناث، وهكذا فإن الذكور (التي تحوي صبغي X وصبغي Y) والإناث (XX) تعبّر عن جينات الصبغي X بالدرجة نفسها. يعني الأزدراع الذاتي إمكانية أخذ الخلايا الجذعية من المرضى واشتقاق الخلايا المتخصّصة المطلوبة وزرعها ثانية في المرضى.

الخلايا الظهارية epithelial والدموية المتعدّدة. وهذه النتائج المدهشة لا يمكن تفسيرها بسهولة عن طريق تحديد غير صحيح لذرّية الخلايا الجذعية المزدرعة. ولكنّ الممكن هو أنّ الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات لا بد أن تتحد مع خلايا الخلية الأرومية [10، 11]، وهذا يفسّر تعدّد وظيفتها في تلك التجربة.

هل تكون الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات مكافئة للخلايا الجذعية الجنينية البالغة؟ إننا نحتاج إلى معطيات أكثر، مع أنّه حتى الآن يبدو أنّ هناك تشابهاً واختلافات مهمّة بين تلك الخلايا (الشكل 2). ما هي إذاً الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات؟ يجب أن تكون خلايا جذعية متعدّدة الإمكانات نادرة جداً والتي تثابر على حياتها من الجنين إلى الحياة البالغة. وللبرهنة على ذلك، من الضروري تحديد هوية هذه الخلايا بصورة متوقّعة في الحي (أكثر من استعادة عرضها في الزجاج) بواسطة البروتينات الواسمة التي تعبّر عنها وتنقيتها بدون تدخّل مرحلة استنبات.

وبصورة بديلة، يجب أن لا تكون الخلايا المولّدة المتعدّدة الإمكانات في الواقع موجودة في الحي. فالفترة الممتدة للاستنبات قد تحثّ بعض خلايا نقي العظم على التراجع إلى حالة أكثر بدائية، تماماً مثل الخلايا الجرثومية الأولية التي منها تُنتج البيوض والنطاف يمكن أن تُعاد برمجتها في المستنبت لاكتساب خواص مثل تلك التي لدى الخلايا الجذعية الجنينية [12، 13]. (في الواقع، لا توجد الخلايا الجذعية الجينية في الأجنّة؛ إنها تنشأ بعد أن تُستنبت). وإذا كان الأمر كذلك، لا بدّ أن نتعلّم الكثير عن كيفية إمكانية الخلايا إعادة برمجتها في المستنبت.

يجب أن ترهن الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات عن فائدتها في معالجة الأمراض بصرف النظر عن منشئها. ولكن، حتى تحديد هويتها في الحي، من السابق لأوانه توقّع أنّ لها دوراً طبيعياً في تصليح النسج المصابة. بالإضافة إلى ذلك، ورغم أنّ الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات يمكن أن تولّد الكثير من أنماط الخلايا المتخصّصة، فإنه يبقى أن نرى فيما إذا كانت تلك الخلايا تعمل بصورة عادية ويمكن أن تُستخدم لمعالجة الحيوانات، كما استخدم كيم وزملاؤه العصبونات المشتقة من الخلايا الجنينية الجذعية. سوف تكون الأولوية لهذه التجارب معطية الإمكانية لعزل الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات من نقي العظم لأي مريض وازدراع ذرّية هذه الخلايا ثانية للمريض بدون خطر الرفض.

إن الفوائد الممكنة لمعالجة الأمراض باستخدام خلايا متخصّصة مولّدة في الزجاج كثيرة جداً، ولكن لا بد من أبحاث إضافية. تتضمّن المخاطر الممكنة قابلية الخلايا الجذعية الجنينية لتشكيل أورام مسخية، ومخاطر غير معروفة من استعمال خلايا – فيما إذا كانت خلايا جذعية أم خلايا مولّدة بالغة متعدّدة الإمكانات – استُنبتت لفترات طويلة. بالإضافة إلى ذلك، ورغم تمتع الخلايا المولّدة البالغة المتعدّدة الإمكانات على ما يبدو بصبغيات عادية، فإن من المهم إثبات أن الممرات المتحكّمة بتكاثر الخلايا تكون غير مشوّشة، وإلّا قد تقع مكاسب الأجل القصير فريسة تعقيدات الأجل الطويل.

إن عمل كيم وزملائه [1] وجيانغ وزملائه [2] لن يحلّ الجدل حول الخلايا الجنينية مقابل الخلايا الجذعية البالغة. في الواقع، إنّه يوضّح الحاجة إلى أبحاث في هذا المجال للاستمرار بلا وازع بالاهتمامات السياسية. وعند ذلك ستكون للجمهور فرصة في الحصول على ما يستحق: معالجات جديدة مثبتة وآمنة لأمراض تصعب معالجتها.

المراجع

REFERENCES

[1] Kim, J.- H. et al. Nature 418, 50-56 (2002); advance online publication, 20 June 2002 (doi: 10.1038/nature00870).

[2] Jiang, Y. et al. Nature 418, 41-49 (2002); advane online publication, 20 June (doi: 10.1038/nature00900).

[3] Wells, W. J. Cell Biol. 157, 15-18 (2002).

[4] Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N. & van der kooy, D. Nature Med. 8, 268-273 (2002).

[5] Kyba, M., Perlingeiro, R. C. R. & Daley, G. Q. Cell 109, 29-37 (2002).

[6] Lumelsky, N. et al. Science 292, 1389-1394 (2001).

[7] Freed, C. R. et al. New Engl. J. Med. 344, 710-719 (2001).

[8] Bjorklund, L. M. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 2344-2349 (2002).

[9] Pittenger, M. F. et al. Science 284. 143-147 (1999).

[10] Ying, Q.- Y., Nichols, J., Evans, E. P. & Smith, A. G. Nature 416, 545-548 (2002)

[11] Terada, N. et al. Nature 416, 542-545 (2002).

[12] Matsui, Y., Zsebo, K. & Hogan, B. L. M. Cell 70, 841-847 (1992).

[13] Donovan, P. J. Curr. Top. Dev. Biol 29, 189-225 (1994).■

هيئة الطاقة الذرية السورية مكتب نظم المعلومات http://serversmiso.aecs.sy

proliferating myocytes and vascular structures. Our studies indicate that locally delivered bone marrow cells can generate de novo myocardium ameliorating the outcome of coronary artery disease.

Key Words

coronary artery, myocardial infarction, stem cells, bone marrow, coronary vesseles, differentiation, mitosis.

★ This article appeared in *Nature*, Vol.410, 5 April 2001. It has been translated into Arabic by Dr. A. Al-Mariri, Atomic Energy Commission of Syria.

STEM CELLS IN EPITHELIAL TISSUES★

J. M. W. SLACK

Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, UK.

ABSTRACT

Most, if not all, epithelial tissues contain stem cells. They are responsible for normal tissue renewal or for regeneration following damage. Our present knowledge of their properties is limited and is mainly derived from studies of cell kinetics and from clonal analysis.

Key Words

epithelial tissue, stem cells, progenitor cells, plasticity.

★ This article appeared in *Science*, Vol.287, 25 February 2000. It has been translated into Arabic by Dr. A. Othman, Atomic Energy Commission of Syria.

STEM CELLS THAT MAKE STEMS★

DETLEF WEIGEL

Plant Biology Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California 92037, USA, and Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, D - 72076 Tubingen, Germany.

GERD JURGENS

Centre for Molecular Biology of Plants (ZMBP), University of Tubingen, D - 72076 Tubingen, Germany.

ABSTRACT

plant stem cells, contained in specialized structures called meristems have amazing regenerative powers. They enable plants to grow and produce new organs throughout lifetimes that can span hundreds of years.

Key Words

stem cells, meristem, quiescent center, pericycle, arabidopsis.

★ This article appeared in *Nature*, Vol.415, 14 February 2002. It has been translated into Arabic by Dr. N. E. Sharabi, Atomic Energy Commission of Syria.

☆ ★ ☆

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

BONE MARROW CELLS ADOPT THE PHENOTYPE OF OTHER CELLS BY SPONTANEOUS CELL FUSION*

N. TERADA, T. HAMAZAKI, M. OKA, M. HOKI, D. M. MASTALERZ, L. MOREL, B. E. PETERSEN
Departmeat of Pathology
N. TERADA, B. E. PETERSEN, E. W. SCOTT
Program in Stem Cell Biology, Shands Cancer Center
Y. NAKANO, E. M. MEYER
Department of Pharmacology
E. W. SCOTT
Department of Molecular Genetics, and Microbiology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida 32610, USA

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated that transplanted bone marrow cells can turn into unexpected lineages including myocytes, hepatocytes, neurons and many others. A potential problem, however, is that reports discussing such "transdifferentiation" in vivo tend to conclude donor origin of transdifferentiated cells on the basis of the existence of donor-specific genes such as Y chromosome markers. Here we demonstrate that mouse bone marrow cells can fuse spontaneously with embryonic stem cells in culture in vitro that contains interleukin-3. Moreover, spontaneously fused bone marrow cells can subsequently adopt the phenotype of the recipient cells, which, without detailed genetic analysis, might be interpreted as "dedifferentiation" or transdifferentiation.

Key Words

transdifferentiation, transplant, stem cell, embryonic cell, bone marrow, genotype, phenotype, cell fusion.

* This article appeared in *Nature*, Vol.416, 4 April 2002. It has been translated into Arabic by Dr. A. A. Morad, Atomic Energy Commission of Syria.

BONE MARROW CELLS REGENERATE INFARCTED MYOCARDIUM*

J. KAJSTURA, S. CHIMENTI, I. JAKONIUK, B. LI, B. N. GINARD, A. LERI & P. ANVERSA
Department of Medicine, New York Medical College, Valhalla, New York 10595 USA
D. ORLIC, S.M. ANDERSON, D. M. BODINE
Hematopoiesis Section, Genetics and Molecular Biology Branch, NHGRI
J. PICKEL, R. MCKAY
Laboratory of Molecular Biology, NINDS, NIH, Bethesda, Maryland 20892, USA

ABSTRACT

Myocardial infarction leads to loss of tissue and impairment of cardiac performance. The remaining myocytes are unable to reconstitute the necrotic tissue, and the post-infarcted heart deteriorates with time. Injury to a target organ is sensed by distant stem cells. Which migrate to the site of damage and undergo alternate stem cell differentiation; these events promote structural and functional repair. This high degree of stem cell plasticity prompted us to test whether dead myocardium could be restored by transplanting bone marrow cells in infarcted mice. We sorted lineage-ngative (Lin^-) bone marrow cells from transgenic mice exprssing enhanced green fluorescent protein by fluorescence - activated cell sorting on the basis of c-kit expression. Shortly after coronary ligation, Lin^- $c\text{-}kit^{POS}$ cells were injected in the contracting wall bordering the infarct. Here we report that newly formed myocardium occupied 68% of the infarcted portion of the ventricle 9 days after transplanting the bone marrow cells. The developing tissue comprised

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

Ch. F. STEVENS

Molecular Neurobiology Laboratory, Howard Hughes Medical Institute at the Salk Institute, 10010, north torrey pines road, La Jolla, California, USA

ABSTRACT

During an investigation of the mechanisms through which the local environment controls the fate specification of a dult neural stem cells, we discovered that adult astrocytes from hippocampus are capable of regulating neurogenesis by instructing the stem cells to adopt a neuronal fate. This role in fate specification was unexpected because, during development, neurons are generated before most of the astrocytes. Our findings, together with recent reports that astrocytes regulate synapse formation and synaptic transmission, reinforce the emerging view that astrocytes have an active regulatory role-rather than merely supportive roles traditionally assigned to them-in the mature central nervous system.

Key Words

central nervous system(CNS), astroglia, neruogenesis, hippocampus, astrocytes.

⋆ This article appeared in *Nature*, Vol.416, 2 May 2002. It has been translated into Arabic by Dr. G. Alia, Atomic Energy Commission of Syria.

PLURIPOTENCY OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM ADULT MARROW⋆

Y. Jiang

Stem Cell Institute

B. N. Jahagirdar, C.M. verfaillie

Division of Hematology, Oncology and Transplantation, Department of Medicine.

R. L. Reinhardt

Department of Microbiology, Center for Immunology.

C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, W. C. Low

Department of Neurosurgery , and Department of Genetics, Cell Biology and Development.

R. E. Schwartz, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg

Stem Cell Institute

D. A. Largaespada

Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota 55455,USA

ABSTRACT

We report here that cells co - purifying with mesenchymal stem cells-termed here multipotent adult progenitor cells or MAPCs-differentiate, at the single cell level, not only into mesenchymal cells, but also cells with visceral mesoderm, neuroectoderm and endoderm characteristics in Vitro. When injected into an early blastocyst, single MAPCs contribute to most, if not all, somatic cell types. On transplantation into a non - irradiated host, MAPCs engraft and differentiate to the haematopoietic lineage, in addition to the epithelium of liver, lung and gut. Engraftment in the haematopoietic system as well as the gastrointestinal tract is increased when MAPCs are transplanted in a minimally irradiated host. As MAPCs proliferate extensively without obvious senescence or loss of differntiation potential potential, they may be an ideal cell source for therapy of inherited or degenerative diseases.

Key Words

embryonic stem cell, cell differentiation, gene therapy.

⋆ This article appeared in *Nature*, Vol 418, 4 July 2002. It has been translated into Arabic by Dr. W. Al-Ashkar, Atomic Energy Commission of Syria.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

M. WERNIG, O. BRÜSTLE
Department of Neuropathology, University of Bonn Medical Center, Sigmund-Freud- Strasse 25, 53105 Bonn, Germany
I. D. DUNCAN
Medical Sciences

ABSTRACT

The remarkable developmental potential and replicative capacity of human embryonic stem (ES) cells promise an almost unlimited supply of specific cell types for transplantation therapies. Here we describe the in vitro differentiation, enrichment, and transplantation of neural precursor cells from human ES cells. Upon aggregation to embryoid bodies, differentiating ES cells formed large numbers of neural tube-like structures in the presence of fibroblast growth factor 2 (FGF-2). Neural precursors within these formations were isolated by selective enzymatic digestion and further purified on the basis of differential adhesion. Following withdrawal of FGF-2, they differentiated into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. After transplantation into the neonatal mouse brain, human ES cell-derived neural precursors were incorporated into a variety of brain regions, where they differentiated into both neurons and astrocytes. No teratoma formation was observed in the transplant recipients. These results depict human ES cells as a source of transplantable neural precursors for possible nervous system repair.

Key Words

embryonic stem cells, transplantation therapy, neural precursors,astrocytes,differentiation.

⋆This article appeared in *Nature Biotechnology*, Vol.19, December 2001. It has been translated into Arabic by Dr. M. E. Iesa, Atomic Energy Commission of Syria.

ASTROCYTES: NEW STARS OF THE BRAIN⋆

F. PFRIEGER
centre de neurochimie de Strasbourg-France
C. STEINMETZ
etudiante en these de neurosciences dans le groupe de F. pfrieger

ABSTRACT

Specification and cooperation between cells are the two essential principles that govern well functioning of living organisms. These principles are often neglected in studies involving the brain. In this concern, any researcher studying biology or medicine agrees with the saying that "neurons are the main active elements in the brain" without underestimating the importance of glial cells fulfilling all free space that neurons leave behind. Among glial cells, astrocytes are the most abundant and great interest in these cells has been shown in the last two years. For a hundred years these cells were considered as filling or nutritive tissues, however, recently it is generally accepted that these cells play a major role in the synapses development and activity. As Nature (May 2002) showed, astrocytes are astonishing. Neurobiologists neglected glial cells and they considered them for a long time as neurons mediators! This is true because without them synapses and neurons do not exist.

Key Words

astrocytes, glue cells, neurone, neuroglia, synapses, ventricule.

⋆ This article appeared in *La Recherche*, N.361, Feb. 2003. It has been translated into Arabic by Dr. G. Alia, Atomic Energy Commission of Syria.

ASTROGLIA INDUCE NEUROGENESIS FROM ADULT NEURAL STEM CELLS⋆

H. SONG, F. H. GAGE
Laboratory of Genetics, The Salk Institute, 10010, north torrey pines road, La Jolla, California, USA

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

3JQ, UK.

EDWARD P. EVANS

Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OXI 3PS, UK.

ABSTRACT

Recent reports have suggested that mammalian stem cells residing in one tissue may have the capacity to produce differentiated cell types for other tissues and organs[1-9]. Here we define a mechanism by which progenitor cells of the central nervous system can give rise to non-neural derivatives. Cells taken from mouse brain were co-cultured with pluripotent embryonic stem cells. Following selection for a transgenic marker carried only by the brain cells, undifferentiated stem cells are recovered in which the brain cell genome has undergone epigenetic reprogramming. However, these cells also carry a transgenic marker and chromosomes derived from the embryonic stem cells. Therefore the altered phenotype does not arise by direct conversion of brain to embryonic stem cell but rather through spontaneous generation of hybrid cells. The tetraploid hybrids exhibit full pluripotent. character, including multilineage contribution to chimaeras. We propose that transdetermination consequent to cell fusion[10] could underlie many observations otherwise attributed to an intrinsic plasticity of tissue stem cells [9].

Key Words

embryonic stem cells (ES cells), progenitor cells, transgenic mice, tetraploid hybrids, brain cells, epigenetic reprogramming, chimaera, transdetermination, transdifferentiation, cell fusion, pluripotency.

⋆This article appeared in *Nature*, Vol.416, 4 April 2002. It has been translated into Arabic by Editorial Board, Atomic Energy Commission of Syria.

EMBRYONIC STEM CELL LINES FROM HUMAN BLASTOCYSTS: SOMATIC DIFFERENTIATION IN VITRO⋆

B. E. REUBINOFF

Monash Institute, Monash University, Melbourne, Australia.

ABSTRACT

We describe the derivation of pluripotent embryonic stem (ES) cells from human blastocysts. Two diploid ES cell lines have been cultivated in vitro for extended periods while maintaining expression of markers characteristic of pluripotent primate cells. Human ES cells express the transcription factor Oct-4, essential for development of pluripotential cells in the mouse. When grafted into SCID mice, both lines give rise to teratomas containing derivatives of all three embryonic germ layers. Both cell lines differentiate in vitro into extraembryonic and somatic cell lineages. Neural progenitor cells may be isolated from differentiating ES cell cultures and induced to form mature neurons. Embryonic stem cells provide a model to study early human embryology, an investigational tool for discovery of novel growth factors and medicines, and a potential source of cells for use in transplantation therapy.

Key Words

embryonic stem cells (ES), embryonal carcinoma cells (EC), transplantation therapy.

⋆This article appeared in *Nature Biotechnology*, April 2000. It has been translated into Arabic by Dr. A. Othman, Atomic Energy Commission of Syria.

IN VITRO DIFFERENTIATION OF TRANSPLANTABLE NEURAL PRECURSORS FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS⋆

S.C. ZHANG, J.A. THOMSON

Department of Anatomy, Neurology, University of Wisconsin, 1500 Highland Avenue, Madison, WI 53705

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

Kyoto Univ., Shogoin Kawaharacho 53, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

S. JORDAN, I. JACKSON

MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh EH4 2XU, UK.

H. OSHIMA, Y. BARRANDON

Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, Paris, Cedex 05, France.

M. OSAWA, M. MORIYAMA, S. NISHIKAWA

Riken Center for Developmental Biology, Minatojima-minamicho 2-2-3, Chuo-ku, Kobe, 650-0047, Japan.

ABSTRACT

Stem cells-which have the capacity to self-renew and generate differentiated progeny- are thought to be maintained in a specific environment known as a niche. The localization of the niche, however, remains largely obscure for most stem-cell systems. Melanocytes (pigment cells) in hair follicles proliferate and differentiate closely coupled to the hair regeneration cycle. Here we report that stem cells of the melanocyte lineage can be identified, using Dct-lacZ transgenic mice, in the lower permanent portion of mouse hair follicles throughout the hair cycle. It is only the population in this region that fulfils the criteria for stem cells, being immature, slow cycling, self-maintaining and fully competent in regenerating progeny on activation at early anagen (the growing phase of hair follicles). Induction of the repigmentation process in K14- steel factor transgenic mice demonstrates that a portion of amplifying stem-cell progeny can migrate out from the niche and retain sufficient self-renewing capability to function as stem cells after repopulation into vacant niches. Our data indicate that the niche a dominant role in the fate determination of melanocyte stem-cell progeny.

Key Words

niche, melanocyte cells, stem-cells, hair follicles, hair pigmentation.

* This article appeared in *Nature*, Vol.416, 25 April 2002. It has been translated into Arabic by Dr. A. Madaniah, Atomic Energy Commission of Syria.

TRANSLATING STEM AND PROGENITOR CELL BIOLOGY TO THE CLINIC: BARRIERS AND OPPORTUNITIES*

I. L. WEISSMAN

Departments of pathology and developmental biology, Stanford university school of medicine, Stanford, CA 94302-5323, USA.

ABSTRACT

Stem cells are the natural units of embryonic generation, and also adult regeneration, of a variety of tissues. Recently, the list of tissues that use the model of differentiation from stem to progenitor to mature cell has increased from blood to include a variety of tissues, including both central and peripheral nervous systems and skeletal muscle; it is also possible that all organs and tissues are derived from, and still contain, stem cells. Because the number and activities of stem cells and their progeny are homeostatically regulated, clinical stem cell transplantation could greatly add to the physician's armamentarium aga'nst degenerative diseases.

Key Words

stem cells, differentiation, transplantation, pluripotent, multipotent, totipotent, monoclonal antibodies (mAb), engraftment, proto-oncogene, regeneration.

* This article appeared in *Science*, Vol 287, 25 February 2000. It has been translated into Arabic by Dr. A. Ekhtiar, Atomic Energy Commission of Syria.

CHANGING POTENCY BY SPONTANEOUS FUSION*

QI-LONG YING - JENNIFER NICHOLS - AUSTIN G. SMITH

Centre for Genome Research, University of Edinburgh, The King's Buildings, West Mains Road, Edinburgh EH9

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

ABSTRACTS OF THE SUBJECTS PUBLISHED IN THIS ISSUE

ARTICLES

OUT OF EDEN: STEM CELLS AND THEIR NICHES*

F. M. Watt
Keratinocyte Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK.
B. L. M. Hogan
Howard Hughes Medical Institute & Department of Cell Biology, Vanderbilt University Medical Centre, Nashville, TN 37232-2175, USA.

ABSTRACT

Stem cells are currently in the news for two reasons: the successful cultivation of human embryonic stem cell lines and reports that adult stem cells can differentiate into developmentally unrelated cell types, such as nerve cells into blood cells. Both intrinsic and extrinsic signals regulate stem cell fate and some of these signals have now been identified. Certain aspects of the stem cell microenvironment, or niche, are conserved between tissues, and this can be exploited in the application of stem cells to tissue replacement therapy.

Key Words

stem cells, cell differentiation, asymmetric, cell division, niche, transcription factor, signal transfer, intracellular clock.

* This article appeared in *Science*, Vol 287, 25 Feb. 2000. It has been translated into Arabic by Dr. A. Bakir, Atomic Energy Commission of Syria.

WHY STEM CELLS?*

D. VAN DER KOOY
Department of Anatomy and Cell Biology, University of Toronto, Faculty of Medicine, Canada.
S. WEISS
Department of Anatomy and Cell Biology, University of Calgary, Faculty of Medicine, Canada.

ABSTRACT

Stem cells are viewed from the perspectives of their function, evolution, development, and cause. Counterintuitively, most stem cells may arise late in development, to act principally in tissue renewal, thus ensuring an organism's long-term survival. Surprisingly, recent reports suggest that tissue-specific adult stem cells have the potential to contribute to replenishment of multiple adult tissues.

Key Words

stem cell, progenitor cell, plastocyst, hematopoietic stem cells, chimera, astrocytes.

* This article appeared in *Science*, Vol.287, 25 Feb. 2000. It has been translated into Arabic by Dr. E. Ghanem, Atomic Energy Commission of Syria.

DOMINANT ROLE OF THE NICHE IN MELANOCYTE STEM-CELL FATE DETERMINATION*

E. NISHIMURA, H. YOSHIDA, Y. MIYACHI, S. NISHIKAWA
Dept. of Mol. Genetics and Dept. of Dermatology, Graduate School of Medicine,

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

INTO HOT WATER
☐ EUROPE CONFRONTS THE EMBRYONIC STEM CELL . . . . . *SCIENCE*. 121
RESEARCH CHALLENGE
☐ STEM-CELL COMPETITION . . . . . *NATURE* 123

ABSTRACTS OF THE SUBJECTS PUBLISHED IN THIS ISSUE IN ENGLISH. 132

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

CONTENTS

ARTICLES

☐ OUT OF EDEN: STEM CELLS AND THEIR NICHES . . . . . F. M. Watt, B. L. M. Hogan . . . 7

☐ WHY STEM CELLS? . . . . . D. VAN DER KOOY, et all . . . 14

☐ DOMINANT ROLE OF THE NICHE IN . . . . . E. NISHIMURA, et all 19
MELANOCYTE STEM-CELL FATE DETERMINATION

☐ TRANSLATING STEM AND PROGENITOR CELL BIOLOGY. . . . . I. L. WEISSMAN 27
TO THE CLINIC: BARRIERS AND OPPORTUNITIES

☐ CHANGING POTENCY BY SPONTANEOUS FUSION . . . . . QI-LONG YING, et all 35

☐ EMBRYONIC STEM CELL LINES FROM HUMAN . . . . . B. E. REUBINOFF, et all 40
BLASTOCYSTS: SOMATIC DIFFERENTIATION IN VITRO

☐ IN VITRO DIFFERENTIATION OF TRANSPLANTABLE . . . . . S.C. ZHANG, et all 50
NEURAL PRECURSORS FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

☐ ASTROCYTES: NEW STARS OF THE BRAIN . . . . . F. PFRIEGER, et all 58

☐ ASTROGLIA INDUCE NEUROGENESIS . . . . . H. SONG, et all 64
FROM ADULT NEURAL STEM CELLS

☐ PLURIPOTENCY OF MESENCHYMAL STEM . . . . . Y. JIANG, et all 74
CELLS DERIVED FROM ADULT MARROW

☐ BONE MARROW CELLS ADOPT THE PHENOTYPE . . . . . N. TERADA, et all 88
OF OTHER CELLS BY SPONTANEOUS CELL FUSION

☐ BONE MARROW CELLS REGENERATE . . . . . J. KAJSTURA 93
INFARCTED MYOCARDIUM

☐ STEM CELLS IN EPITHELIAL TISSUES . . . . . J. M. W. SLACK 100

☐ STEM CELLS THAT MAKE STEMS . . . . . D. WEIGEL 105

NEWS

☐ CELL FUSION CAUSES CONFUSION . . . . . *NATURE* 113

☐ IN THE STEM-CELL DEBATE, NEW CONCEPTS . . . . . *NATURE* 115
NEED NEW WORDS

☐ FETAL NEURON GRAFTS PAVE THE WAY FOR . . . . . *SCIENCE* 116
STEM CELL THERAPIES

☐ A MONOCLONAL MOUSE ? . . . . . *NATURE* 118

☐ NAME-CALLING GETS STEM-CELL RESEARCHER . . . . . *NATURE* 120

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

Notice: Scientific matters and different inquiries; subscriptions, address changes, advertisements and single copy orders, should be addressed to the journal's address:
Damascus, P.O. Box 6091 Phone 6111926/7, Fax 6112289, Cable; TAKA.
E-mail: aalam_al_zarra@aec.org.sy
Subscription rates, including first class postage charges: a) Individuals *$ 30 for one year*
b) Establishments *$ 60 for one year*
c) For one issue *$ 6*
It is preferable to transfer the requested amount to:
The Commercial Bank of Syria N-13 P.O. Box 16005 Damascus-Syria account N-3012\2
Cheques may also be sent directly to the journal's address.

The views expressed in any signed article in this journal do not necessarily represent those of the AEC of Syria, and the commission accepts no responsibility for them.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية

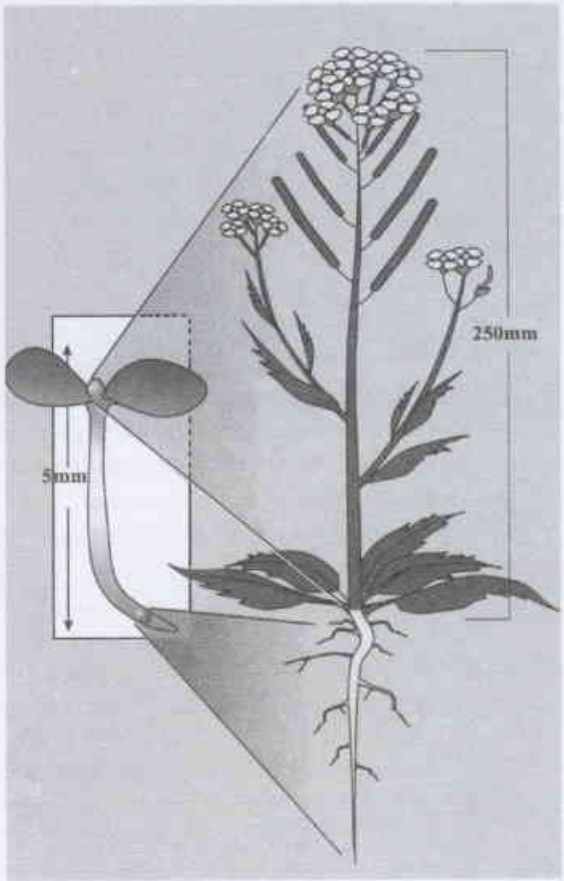
Managing Editor
Dr. Ibrahim Othman
Director General of A. E. C. S.

Editorial Board
Dr. Tawfik Kassam
Editor In-Chief

Dr. Mohammed Ka'aka
Dr. Fouad Al-Ijel
Dr. Ahmad Haj Said
Dr. M. Fouad Al-Rabbat
Dr. Elias Abouchahine

AALAM AL-ZARRA

JOURNAL OF THE ATOMIC ENERGY COMMISSION OF SYRIA



87
18th Year / September - October
2003

A journal published in Arabic six times a year, by the Atomic Energy Commission of Syria. It aims to disseminate knowledge of nuclear and atomic sciences and of the different applications of Atomic energy.

http://serversmiso.aecs.sy مكتب نظم المعلومات هيئة الطاقة الذرية السورية