مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 39- عدد 4 (2023): 11-24

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 39 No.4 (2023): 11 -24

عزل خلايا الأرومة الليفية الجلدية من جلد الجرذان Wister rat البالغة واستنباتها

نبال كبول[1] أ.د. أميرة أومري[2] أ.م.د. نزار عيسى[3]

[1] طالب ماجستير، قسم البيولوجيا، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
[1] أستاذ، قسم البيولوجيا، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ مساعد، قسم البيولوجيا، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

الملخص

يهتم الباحثون في استنبات الخلايا الجذعية وحفظها سواءً أكانت جنينية أم بالغة لأغراض علمية وعلاجية، تعد الأرومة الليفيّة Fibroblast أصل اللحمة المتوسطة mesenchymal origin، واستُخدمت في تطبيقات العلاجات الخلويّة كونها تساهم في عملية التئام الجروح ولها قدرة تجديد عالية.

تمّ عزل الأرومات الليفيّة من جلد الجرذان البالغة (20 جرذاً ذكراً بالغاً)، واستنباتها في وسط DMEM و15% FBS ضمن علبة استنبات مطلية بالجيلاتين في حاضنة CO_2 وفق الشروط ($5\%co_2$ـ درجة حرارة 37° –رطوبة 75)، وتمت دراسة الأرومات الليفية بوساطة المجهر المقلوب حيث لوحظت خلايا ذات استطالات وتفرعات عديدة أظهرت التصاقاً واضحاً بقاع علبة الاستنبات، وبدا وسط الاستنبات شفّافاً دون أية عكارة أو تلوّث جرثوميّ أو فطريّ، وحافظ الوسط على اللّون الورديّ. وخلال التجارب تم اختيار الشروط الأكثر ملاءمة مع بذل الجهود اليومية الحثيثة والمتواصلة لإبقاء تلك الخلايا سليمة ومحمية حتى تتكاثر بسهولة ويسر.

الكلمات المفتاحية: الأرومة الليفيّة_ جلد الجران_ الاستنبات الخلوي.

تاريخ الإيداع: 2022/05/23
تاريخ الموافقة: 2022/08/14

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Isolation and culture of skin Fibroblast from skin of the adult Rats (Wister rat)

Nibal Kaboul[1] Dr. Amira Aumari[2] Dr. Nizar Issa[3]

[1] Master´s Student, Department of Biology, Faculty of science, Damascus University, Syria.
[2] Professor,, Department of Biology, Faculty of science, Damascus University, Syria
[3] Assistant Professor,, Department of Biology, Faculty of science, Damascus University, Syria

Abstract

Researchers are interested in culture and storage of stem cells, whether embryonic or adult, for scientific and therapeutic purposes. The fibroblast are the origin of the mesenchymal cells, the fibroblast used in cellular therapies, because they help in wound healing and they have a high regeneration capacity.

Fibroblasts were isolated from the skin of adult rats (20 adult male rats), and cultured in DMEM and 15% FBS medium in a gelatin-coated culture box in a CO2 incubator under the conditions (5% co2-temperature 37°- humidity (75°C).

Were studied under inverted microscope, it was observed that cells with many elongations and branches showed clear adhesion to the bottom of the culture flask. The culture medium appeared transparent without any turbidity or bacterial or fungal contamination, and the medium maintained the pink color.

Through the experiment, the most conditions with making daily and continuous efforts to keep these cells healthy and protected so that they can reproduce easily.

Received :2022/05/ 23
Accepted:2022/08/14

Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Key words: Fibroblasts_ Rat skin _ Cell Culture**.**

المقدمة:

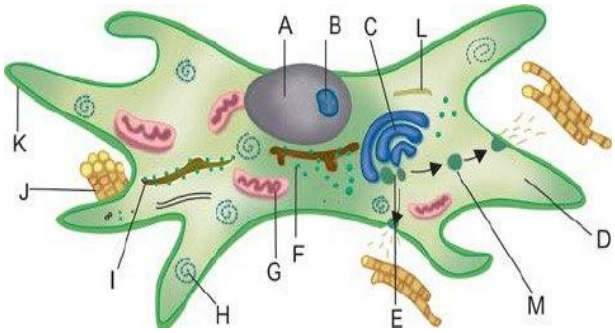
يهتم الباحثون في الحصول على الظروف والشروط المثلى لعزل واستنبات الخلايا في الزجاج in vitro سواءً أكانت جنينية أم بالغة وحفظها في السائل الآزوتي لمدة طويلة (Aumari, 2012)، حيث إن دراسة العمليات الفيزيولوجية للخلية كانت الدافع الرئيس لتطوير الاستنبات الخلوي.

الاستنبات الخلوي هو أحد الطرق الرئيسية المستخدمة في الأبحاث الدراسية اليوم، نظراً لكون المستنبت الخلوي يشكل بيئة مناسبة لتقييم تأثير الأدوية المختلفة ومستحضرات التجميل والمواد الكيميائية وفي إنتاج اللقاح وفي العلاج الجيني والهندسة الوراثية وغيرها من الأبحاث الدراسية(Kheirollah et al., 2016) .

تعدُّ الأرومة الليفيّة المكوّن الأكثر أهمية للنّسيج الضام المكوّن للأدمة (Kheirollah et al., 2016). كونها تلعب الأرومة الليفية دوراً في تنظيم النسيج الضام وفاعليته في حالتي الصحة والمرض من خلال توزعها ونسبتها ضمنه (Ravikanth et al., 2011)، كون الأرومة الليفيّة خلايا ميزنشيمية (Marsh et al., 2021)، تشتق من الأدمة الوسطى الجنينية (Kisiel & Klar, 2019).

النسيج الضّام موجود في أماكن عديدة من الجسم (Kheirollah et al., 2016) (Marsh et al., 2021)، لكن الجلد هو أنسب الأنسجة التي يمكن استخدامها كمصدر للأورمات الليفية (Rittié & Fisher, 2005)، تلعب دوراً في دعم عملية التئام الجروح الطبيعيّة(Abbasi et al., 2020) (Ichim et al., 2018).(Buechler et al., 2021)، كما لها قدرة تجديد عالية (Buechler et al., 2021) (Nilforoushzadeh et al., 2017)، وهي عنصر أساس في الجلد، فهي لا تُنتج فقط خلايا المطرق بل تنظمها أيضاً كما أنها تتواصل مع بعضها من جهة ومع أنواع الخلايا الأخرى، وتلعب دوراً مهمّاً في تنظيم فيزيولوجيا الجلد وفي إصلاح جروحه، وفي هندسته الحيويّة (Sorrell & Caplan, 2004).

فعند إصابة النّسيج تُهاجر الأورمات الليفيّة إلى موقع الإصابة حيث يتمّ استدعاؤها إلى موقع الجرح بوساطة عمليات الجذب الكيميائي chemoattractanis (Ichim et al., 2018) تبدأ بترسيب الكولاجين الجديد وفي المرحلة التكاثرية proliferative phase مسهلة عملية شفاء الجرح.



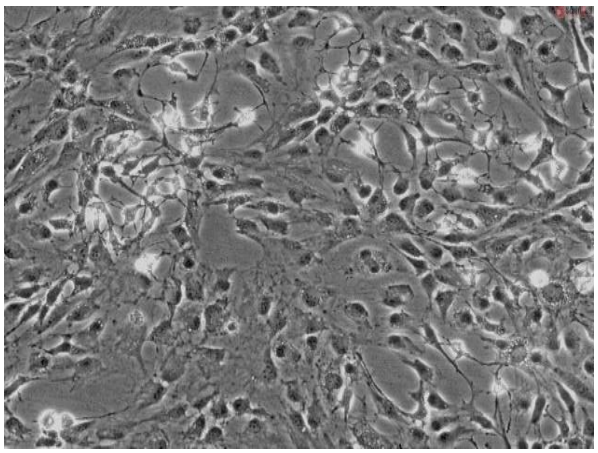
الشكل (1): a) شكل تخطيطي لهيكل الأرومة الليفية.
(V Sandhu et al., 2012)

ولقد تمّ وصف الأورمات الليفية لأول مرة مورفولوجياً من قبل فيرشو وتمّ دوفال في نهاية القرن التاسع عشر (Williams & Thornton, 2020).

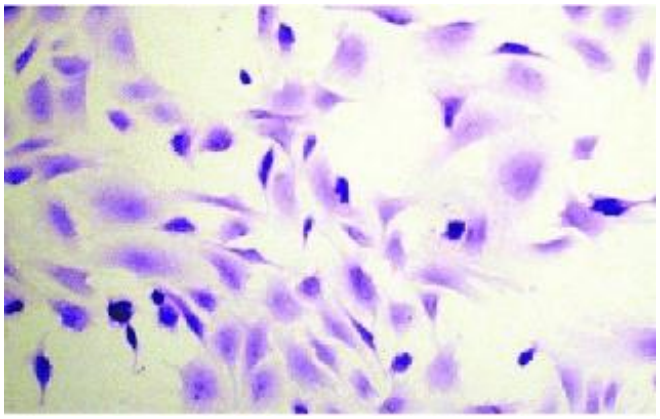
فهي تمتازُ بكبر حجمها وتسطّحها واستطالاتها الطّويلة والمتفرّعة، وتبدو في مظهرها الجانبي مغزليه الشّكل، نواتها بيضويّة وسيتوبلازما ها متجانسة (Ravikanth et al., 2011) الشكل (1): a) يوضح هيكل الأرومة الليفية: A النواة، B النوية، C جهاز غولجي، D السيتوبلاسما، E حويصلات ناقلة، F ريبوزوم، G ميتوكوندريا، H ريبوزومات متعددة، I الشبكة البلاسمية الداخلية الخشنة، J ألياف الكولاجين،K عمليات خلوية، L الأنيبيبات الدقيقة، M حبيبات مفرزة **(V Sandhu et al., 2012)**.

b) يوضح الأرومة الليفية من جلد الإنسان تحت المجهر ذو تكبير**100X (Nilforoushzadeh et al., 2017)**.

c) الأرومة الليفية في جلد الفئران ملونة بالهيماتوكسيلين – ايوزين ذي التكبير 200X (Zhao et al., 2016)



الشكل (1): b): الأرومة الليفية من جلد الإنسان. (Nilforoushzadeh et al., 2017)



الشكل (1): c) الأرومة الليفية في جلد الفئران. (Zhao et al., 2016)

تمت دراسة عزل الأورمات الليفية الجنينية لدى أجنة القوارض بشكل جيد، ولكن عزلها من القوارض البالغة يواجه صعوبات بالغة، ويشكل تحديا للباحثين (Seluanov et al., 2010). كما أن استنبات الأرومة الليفية في المختبر يعتمد نموذجاً مفيداً لدراسة وظائفها في الحالات الطبيعية والمرضية ضمن شروط بيئية قابلة للسيطرة من قبل الباحث(Kisiel & Klar, 2019)/(Rittié & Fisher, 2005).

كما يمكن استخدام الأورمات الليفية مباشرةً بعد عزلها من الجلد في أبحاث البيولوجيا الجزيئية وفي الفحوصات الوظيفية (Henrot et al., 2020) وفي التطبيقات العلاجية الخلوية لمرضى الحروق وجروح السكري وشيخوخة الجلد، كما تم تطبيقها سريرياً على العديد من المرضى وأثبتت نجاحها (Nilforoushzadeh et al., 2017) ، وفي علاج التهاب المفاصل الرثياني كونها تلعب دوراً في الحفاظ على توازن المفاصل عند زيادة حدة الإصابة (Marsh et al., 2021) وكما استخدمت الأرومة الليفية على نطاق واسع في الدراسات الخلوية والجزيئية لكونها أحد أسهل أنواع الخلايا التي تنمو في المستنبت Culture (Rombouts et al., 2002)

تهدف هذه الدراسة إلى: إيجاد طرق حديثة ومبسطة مناسبة لعزل الأورمات الليفيّة واستنباتها من الحيوانات البالغة إلى إجراء هذه الدراسة والاستفادة منها في الأبحاث العلمية.

مواد البحث وطرائقه:Materials and Methods

نستعرض في هذا البحث خطوات عملية لكيفية عزل الأرومة الليفية واستنباتها من جلد الجرذان البالغة وحفظها في السائل الآزوتي.

أجريت التجارب في مختبرات قسم علم الحياة الحيوانية–كلية العلوم–جامعة دمشق.

1) المواد:

- وسط استنبات DMEM High Glucose شركة Euro Clone S.P.A
- وسط استنباتRPMI شركة Euro Clone S.P.A
- مصل جنين بقريّ (Fetal bovine serum) (FBS) شركة GENAXXON
- وسط Dulbecco´s PBS powder dpbs شركة Simply
- L-glutamine شركة HY Clone
- Pencilium – streptomycin شركة Simply
- جيلاتين Gelatine gepulvert 0.1% شركة Simply
- تربسين Trypsin شركة Simply
- أزرق الميتلين Methylene blau شركة MERCK
- إيثانولEthanol absolute 70% شركة Panreac
- Amphoferieins B شركة Simply
- الأيثر Diethyl Etherشركة euro lab

2) الأجهزة:

- غرفة زراعة خلوية عقيمة.Biohazard Safety Cabinet (class II type AZ model: js cb-900sb) brand's Korea
- حاضنة co2_. Shellab35o2 co2 water jacketed in cubator
- جهاز تثفيل (جهاز نبذ مركزيّ).Hitachi EBA 20s bench top centrifuge
- جهاز الأوتوغلاف JSR-Model JSAC -100-Autooclave
- حاضنة اهتزاز **unimax1010** Heidolph
  Heidolph Inkubator1000
- مجهر مقلوب موديل Optika مزوّد بكاميرا Optika_موصول بحاسوب مزودّ بالبرامج المطلوبة للعمل.
- مجهر ضوئي Optika.
- صفيحة نيوبار NEUBAUER W.GERMANY BLAUBRAND.
- حمّام مائي Instructions
- ميزان حسّاس SARTORIUS.
- محرّك مغناطيسيّ STUART.
- رجّاج yellow line TTS2 vortex .
- علبة زراعة خلويّةT25 شركة EuroClone S.P.A
- أطباق زراعة خلويّة شركة EuroClone S.P.A.
- مجمّدة (–20) ومجمدة (–80) وخزان آزوت.

3) ولقد تمّ تحضير الأوساط المطلوبة وفق الجدول التالي:

الشكل (2) يوضح الشكل التالي مكونات الأوساط المستخدمة في دراستنا

اسم الوسط	مكونات الوسط	اسم الشركة
وسط نقل العينة(A) Transportation medium	1) RPMI 2) Antibiotic(penicillin-streptomycin)	شركة EuroClone S.P.A شركة Simply
وسط غسل العينة(B) Washing medium	Dpbs (Dulbecco´s PBS powder)	شركة Simply
وسط الهضم(C) Digestion medium	1) Trypsin 2) Disease	شركة Simply شركة Simply
وسط الاستنبات الخلوي(D) Culture medium	1) DMEM H.G 2) L-glutamine 3) FBS(Fetal bovine serum) 4) Antibiotic(penicillin-streptomycin) 5) Amphotericin B 6) Gelatine 0.1%	شركة Euro Clone S.P.A شركة GENAXXON شركة Simply شركة HYClone شركة Simply شركة Simply
وسط الاستنبات الثانوي Subculture (passage)	1) Trypsin 2)(DMEM H.G+L-glutamine+FBS (Fetal bovine serum)+Antibiotic (penicillin-streptomycin)+ Amphotericin B) 3) Gelatin 0.1%	شركة Euro Clone S.P.A شركة GENAXXON شركة Simply شركة HYClone شركة Simply شركة Simply
وسط التجميد Freezing medium	1) Trypsin 2) (DMEM H.G+ L-glutamine+FBS(Fetal bovine serum)+Antibiotic(penicillin-streptomycin)+Amphotericin B) 3)Freezing medium: (DMEM H.G + DMSO + FBS)	شركة EuroClone S.P.A شركة GENAXXON شركة Simply شركة HYClone شركة Simply شركة Simply

4) حيوانات التجربة: Experimental Animal

تمّ الحصول على ذكور جرذانٍ بيضٍ waster Rats بالغة من هيئة الطّاقة الذّريّة بدمشق بعدد 20 وعمر شهر ونصف بوزن(60-100g)، وتمّ توزيعها في أقفاص بلاستيكيّة بشكل عشوائيّ، حيث تم وضع كل جرذ في قفص منفرد وهو حر الوصول للغذاء والماء.

جهزت الأقفاص بقوارير خاصّة لشرب الماء ذات سعة 250مل، وفُرشت الأقفاص بنشارة الخشب، ضمن ظروف صحيّة مناسبة، مع تقديم الرّعاية الصّحيّة لها من نظافة وتبديل الفرش وتعقيمها بشكلٍ يوميٍّ، وبدرجة حرارة الغرفة التي تتراوح بين 27-25 درجة مئوية ورطوبة 40% وبوجود إضاءة بمعدّل 12/ سا وظلام12/ سا، كما تمّت تغذية الحيوانات بعلف مركّز بشكلٍ يوميٍّ، وتُركت تلك الجرذان لمدّة 15يوماً لتتأقلم مع الظّروف المحيطة قبل البدء بالتجربة.

طرائق العمل:

1) تخدير الجرذان:

تمّ استخدام الإيثر في عمليات التخدير وفقاً للمبادئ والقوانين العلمية والأخلاقيّة، وتمّ التّخدير عن طريق الاستنشاق لكونه آمناً وخالياً من المضاعفات، وتتوقّف كمّيّة المخدّر المستخدَم وزمن التّخدير على وزن الحيوان (Miranda et al., 2011)،
قبل البدء بإحداث الجرح على ظهر الجرذ من أجل الحصول على النّسيج، تمّ وضع الجرذ في غرفة التّخدير الشكل(3) وعند التأكّد من حدوثه يثقل الجرذ إلى ساحة العمل المعقّمة، وعند الانتهاء من العمل تمّ التأكّد من صحّة الجرذ وسلوكه الفيزيولوجيّ.

الشكل (3): الجرذ داخل حجرة التّخدير (من تصوير الباحث).

2) إحداث جرح على ظهر الجرذ للحصول على قطع النسيج:

تمّ اتباع الخطوات التالية:

- تحضير ساحة العمل وتعقيم جميع الأدوات المستخدمة بالإيثانول 70% وتعقيم أدوات التّشريح المُستخدمة بـ الأوتوغلاف (Escada, 2018)
- إزالة شعر المنطقة الّتي أُخذ منها عيّنات الجلد وتعقيمها بشكلٍ جيّدٍ بالبو فيدون–يود 10% والإيثانول 70% (Siengdee et al., 2018).
- مراقبة الجرح ليتعافى بالآلية الفيزيولوجيّة الطبيعيّة لالتئام الجروح حفاظاً على حياة الجرذ.

الشكل(4): a) تحديد مكان إزالة قطعة الجلد وتعقيمه.
(من تصوير الباحث)

الشكل(4): b) إزالة قطعة الجلد باستخدام المقص والملقط المعقّم
(من تصوير الباحث).

الشكل(4): c) إحداث الجرح على ظهر الجرذ.
(من تصوير الباحث)

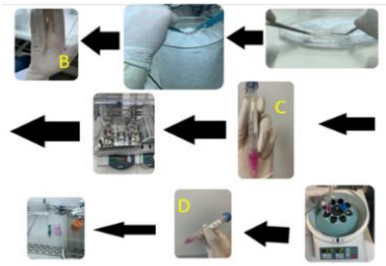
3) الحصول على الأورمات الليفية:

تمّ اتباع الخطوات التالية:

- أخذ عيّنة الجلد من الجرذ ووضعها في الوسط A (الشكل 2) .
- نقل العيّنة إلى أطباق بتري تحوي الوسط B (الشكل 2) على الجليد، تقطيع العيّنة إلى قطع صغيرة باستخدام مشرط.

- نقل العينة إلى أنابيب 15ML مع Dpbs (الشكل2) وتحريكها إلى الأعلى والأسفل، ثمّ تثفيل بسرعة 1000 rpm ولمدّة دقيقتين(Kheirollah et al., 2016)، وإزالة Dpbs (الشكل 2) من الأنابيب، ثمّ إضافة الوسط C (الشكل2) إلى الأنابيب.

الشكل(5): يوضح جميع الخطوات المشتركة المطبّقة أثناء العمل (من تصوير الباحث).



الشكل (6): يوضح جميع الخطوات المشتركة المطبّقة أثناء العمل (من تصوير الباحث).

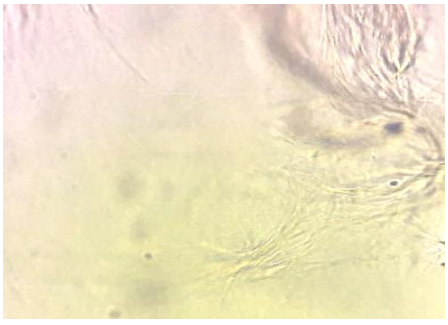
- تُوضع الأنابيب في حاضنة الاهتزاز عند 37 درجة مئويّة لمدّة 10دقائق.
- تثفيل بسرعة 1100 rpm ولمدّة دقيقتين وإزالة الطّافي.
- صبّ الوسط D (الشكل 2) وتحريك العيّنة للأعلى والاسفل، وتثفيل بسرعة 1100 rpm ولمدّة دقيقتين وإزالة الطّافي.
- نقل الخلايا الى علبة الاستنبات T25 المطليّة بمادّة الجيلاتين 1%(Aumari, 2012)
- إكمال الحجم إلى 5مل من وسط الاستنبات D (الشكل 2)
- حضن علبة الاستنبات في حاضنة CO_2 وفق الشروط ($5\%co_2$-درجة حرارة 37° –رطوبة 75%).،
- تبديل وسط الاستنبات بعد 72ساعة من الاستنبات الأولي.

النتائج والمناقشة:

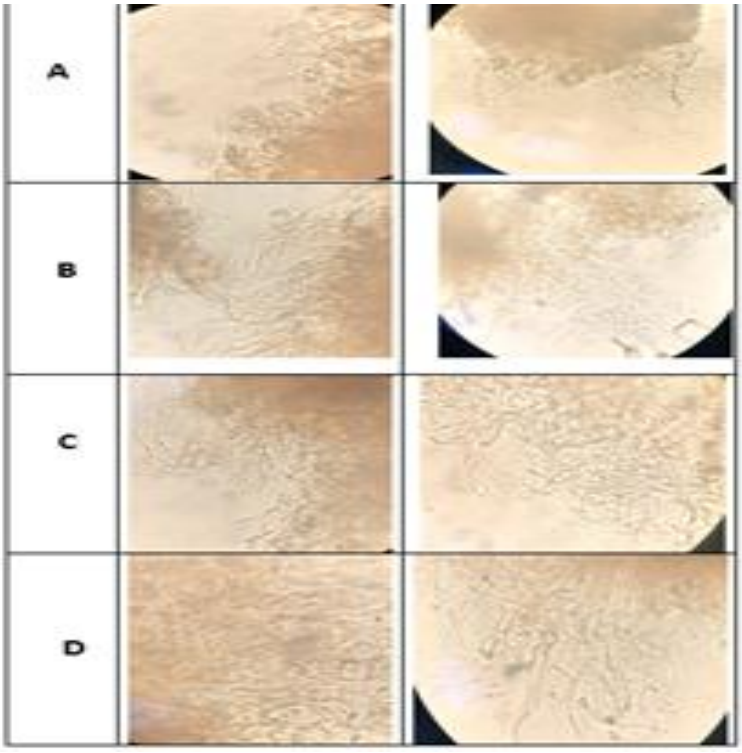
1) الاستنبات الأوّليّ للأرومات الليفيّة: Primary culture of fibroblast

تمّ فحص الخلايا المستنبتة بوساطة المجهر المقلوب (optika) مع تكبير (200X & 400X). ولوحظ وجود خلايا ذات استطالات وتفرعات عديدة تمتلك نواة بيضويّة وسيتوبلازما، وهذا ما يتطابق مع مورفولوجيا الأرومة الليفيّة (Rittié & Fisher, 2005).، كما أظهرت الأرومات الليفيّة أيضاً التصاقاً واضحاً في قاع علبة الاستنبات الشكل (7).

وبدا وسط الاستنبات شفّافاً دون أيّة عكارة أو تلوّث جرثوميّ أو فطريّ، وحافظ الوسط على اللّون الورديّ الشكل(8).



الشكل (7): يوضح الأرومة الليفية تحت المجهر خلايا ذات استطالات عديدة في اليوم الثامن من الزرع و التكبيرX400 (من تصوير الباحث)



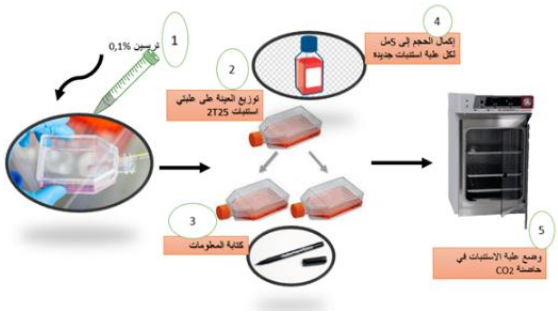
الشكل(8) A) يوضح قطع الجلد المسحوقة نتيجة الهضم الميكانيكي والأنزيمي لقطعة الجلد في اليوم الأول من الاستنبات ذو تكبير X200.
B) يوضح هجرة الخلايا وبداية الالتصاق على قاع علبة الاستنبات في اليوم السادس من الاستنبات ذو تكبير X200.
C) يوضح هجرة الخلايا والتصاق واضح في اليوم العاشر من الاستنبات ذو تكبير X200.
D) يوضح امتلاء علبة الاستنبات وتشكيل طبقة تغطي أكثر من 75% من سطح الطبق في اليوم الرابع عشر مما يستدعي الحاجة إلى إجراء تمرير الاستنبات ذو تكبير X200. (من تصوير الباحث)

2) الاستنبات الثّانويّ للأرومة اللّيفيّة Subculture of fibroblast:

عندما تنمو الأورمات الليفية في مرحلتها التكاثرية تزداد كثافة الخلايا وتملأ علبة الاستنبات وتشكل طبقة Monolayer تغطي أكثر من 75% من سطح العلبة تقريباً، وذلك بعد مرور أسبوع إلى خمسة عشر يوماً تبعاً لنمو الخلايا، مما يستدعي القيام بتمرير الخلايا passage ، نظراً لأنه إذ لم يحدث تقليل للكثافة الخلوية سوف تنفصل الأورمات الليفية عن القاع وتموت (Rittié & Fisher, 2005).

وتحصل عملية التمرير وفق الخطوات التالية:

- أضافة التربسين المحضّر حديثاً إلى علبة الاستنباتT25 بتركيز0.1% من أجل فكّ الارتباط بين الخلايا وقاع علبة الاستنبات.
- توزيع العيّنة على علبتي استنبات 2T25 بمقدار نصف الكمّيّة في كلّ علبة استنبات نكتب على كل علبة استنبات جديدة معلومات تتضمن: اسم الخلايا، ورقم يبين عدد مرات الاستنبات الثانوي وتاريخ الاستنبات.
- أضافة وسط استنبات إلى كلّ علبة جديدة واستكمال الحجم إلى 5مل لإبطال مفعول التربسين، وضع علبة الاستنبات T25 في الحاضنة ($5\%co_2$- درجة حرارة 37° – رطوبة 75%)
- تبديل وسط الاستنبات كل 48ساعة، ومراقبة الخلايا كل يومين باستخدام المجهر المقلوب optika. الشكل(9)



الشكل(9): خطوات الاستنبات الثانوي، (من اعداد الباحث).

3) اختبار نمو وحيويّة الخلايا:

إحصاء عدد الخلايا:

نقوم بعد الخلايا قبل إجراء الاختبارات الحيوية باستخدام صفيحةNEUBAUER IMPROVED BRAND(Campbell, 2015) وذلك وفق الخطوات التالية:

- إضافة تربسين0,1% إلى علبة الاستنبات T25، نقل المعلق إلى أنبوب تثفيل ثمّ تثفيل بسرعة 1100 rpm و لمدّة دقيقتين وإزالة الطّافي.
- إضافة وسط الاستنبات لتخفيف كثافة الخلايا لتسهيل العدّ.
- سحب 10 ميكرو ليتر من محلول الخلايا بوساطة ماصّة ميكرويّة Micropipette إلى أنبوب 1,5مل وتمديده عدة مرات بإضافة كمية من وسط الاستنبات.
- سحب 10 ميكرو ليتر من محلول الخلايا إلى أنبوب 1,5مل وإضافة 10ميكرو ليتر من ملوّن أزرق الميتلين (Campbell, 2015) لتحديد حيويّة الخلايا.
- سحب 10ميكرو ليتر من المعلق ووضعها على صفيحة العدّ.

وتم حساب عدد الخلايا وفق العلاقة التالية:

عدد الخلايا / مل= عدد الخلايا× نسبة التمديد×10^4

لقد بلغ متوسط عدد الخلايا في دراستنا =2.5×10^5 خلية /مل.

حيوية الخلايا: cell viability

تم تحديد حيوية الخلايا باستخدام الملون الذي يلون الخلايا الميتة فقط باللون الأزرق أما الخلايا الحية فتبقى بيضاء لامعة (Campbell, 2015). وتم حساب حيوية الخلايا وفق العلاقة التالية:

حيوية الخلايا=(1 – (عدد الخلايا الميتة/ عدد الخلايا الكلي))×100

وقد بلغ متوسط حيوية الخلايا 65% .

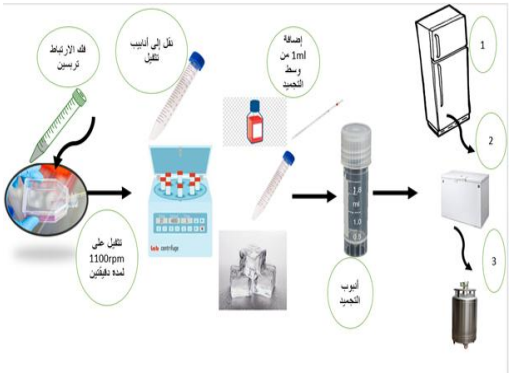
4) حفظ الخلايا بالتّجميد: cryopreservation

تمّ تجميد بعض من الأورمات الليفية للاستخدام اللاحق في أبحاث دراستنا.

وذلك وفق الخطوات التّالية:

- فكّ ارتباط الخلايا، نقل الوسط إلى أنابيب تثفيل 15ml ، والتثفيل بسرعة1100 rpm ولمدّة دقيقتين وإزالة الطّافي.
- إضافة 1mlمن وسط التّجميد على الجليد إلى أنبوب التثفيل، نقل محلول الخلايا إلى أنابيب التّجميد 1.5ml على الجليد.

- حفظ أنابيب التجميد في الثلاجة بدرجة حرارة c˚ 4 لمدة 4ساعات ثمّ نقل الأنابيب إلى المجمّدة بدرجة °20- لمدّة ساعة، ثمّ نقلها إلى المجمّدة °80- لمدّة 24ساعة، وبعدها نُقلت إلى خزان الآزوت السّائل لحفظ الخلايا لمدّة أطول لحين الاستخدام (Siengdee et al., 2018). الشكل (10)



الشكل (10): خطوات التجميد، من اعداد الباحث.

أمكن عزل واستنبات العديد من الخلايا الحيوانية في الزجاج وتمت الاستفادة منها في الأبحاث الدراسية المخبرية، لقد كان الحصول على عينات الجلد لعزل الأورمات الليفية من الجرذان البالغة أسهل من الحصول على عينات الجلد لعزلها من الأجنة لدى أناث الجرذان الحوامل(Seluanov et al., 2010).

تمّ في عام 2016 (Kheirollah et al., 2016) عزل الأورمات الليفيّة الجلديّة لأجنّة الفئران وزرعها في وسط استنبات دون أي صادّات حيويّة وبتكلفة بسيطة مع الحدّ الأدنى من معدّات المختبرات (Kheirollah et al., 2016)

لم يعد عزل الأورمات الليفيّة البالغة يشكّل عائقاً أمام الباحثين، ففي عام 2010 تمّ إجراء عزل الأورمات الليفيّة البالغة من جلد الجرذان البالغة في منطقة الإبط واتبع الباحثون نفس طرق عزل الأورمات الليفيّة الجنينيّة مع إجراء بعض التعديلات: استغرق الجلد وقت هضم بين (30-90) دقيقة أطول من الوقت المستخدم في طرق عزل الأورمات الليفيّة الجنينيّة وتمّ استخدام وسط الزّرع DMEM/F12ومصل جنينيّ بقريّ FBC بتركيز 15% وأنزيم Liberace (Seluanov et al., 2010)

يتوافق هذا مع بحثنا من خلال نسبة المصل الجنيني البقري FBC المستخدم في الدراسة حيث نمت الأورمات بشكل أفضل من النسب الأقل، لكنه يخالف بحثنا، حيث أضفنا الصادات الحيوية بنسبة قليلة إلى الوسط (Siengdee et al., 2018)، كما أننا استخدمنا أنزيم التربسين وأنزيم الديسباز عوضاً عن أنزيم Liberace المستخدم في البحث(Siengdee et al., 2018).

عام 2018 أُجريت دراسة على عزل الأورمات الليفيّة من جلد أذن الفيل الآسيويّ بعد وفاته وتمّ التّعديل على طريقة العزل من خلال مضاعفة تركيز الصّادّات الحيويّة (البكتيريّة والفطريّة) إلى عشرة أضعاف التّركيز الطّبيعيّ. واستخدام أنزيم الكولا جيناز هذا يتوافق مع الأبحاث الأخرى ويُخالف دراسة (Siengdee et al., 2018) ودراستنا حيث استخدامنا أنزيم الديسباز وأنزيم التربسين وحصلنا على نتيجة جيدة للهضم هذا يوافق ما توصلوا إليه في البحث (Henrot et al., 2020).

تمّ أيضاً إدخال وسيط جديد إلى طرق عزل وزراعة الأورمات الليفيّة الجنينيّة للجرذان من خلال تطبيق طريقة ELISA لتقييم نموّ الخلايا، وتمّ إدخال عوامل نموّ متعدّدة رغم وجود الغلوتامين(Jozefczuk et al., 2012) أما في بحثنا فقد اقتصرنا على الغلوتامين فقط كعامل نمو وأعطى ذلك نتيجة جيدة، أما فيما يتعلق بتحديد نمو الخلايا فقد كان من خلال إحصاء عدد الخلايا والفحص المجهري، أما حيويتها فكانت من خلال حساب حيوية الخلايا المذكورة سابقاً. وفي عام 1979 تم تطبيق الكولاجين في الزراعة الخلوية للمرة الأولى (EUGENE BELL, BENGT IVARSSON, 1979) نظراً لكون الأورمات الليفية في الجلد على اتصال مع الكولاجين من النمط الأول.

غالباً ما تتم زراعة الأورمات الليفية على سطوح مطلية بالكولاجين لتأمين بنية مشابهة للجسم الحي، وعند زراعة الأورمات الليفية مع الكولاجين تظهر الأورمات باستطالات ولها تشعبات عديدة وتتكاثر بشكل أبطأ(Rittié & Fisher, 2005)، بينما تكون الأورمات الليفية المزروعة دون كولاجين مسطحة ومغزليه ومنتظمة في ماتريكس متوازية (Kheirollah et al., 2016)،
في دراستنا تم استخدام مادة الجيلاتين 0.1%، حيث تمّ طلي علبة الاستنبات فيها لمدة 2دقيقة قبل الاستنبات وأعطى الجيلاتين نتيجة ممتازة للالتصاق الأورمات وهجرتها مقارنة بالأورمات الليفية المستنبتة في علب استنبات دون طليها بالجيلاتين، لكن كان النمو بالنسبة للأورمات أبطأ حيث استغرق اكتظاظ قاع علبة الاستنبات مدة أطول مع الجيلاتين، وهذا يتوافق مع البحث (Aumari, 2012).

الاستنتاج:

أثبتنا أن عزل الأورمات الليفيّة من جلد الجرذان البالغة واستنباتها في وسط DMEM و%FBS15 مع صادات حيوية بتراكيز معتدلة، باستخدام أنزيم التربسين وأنزيم الديسباز، واستنباتها في علبة استنبات مطلية بالجيلاتين مع تأمين عقامة تامة في العمل، يحافظ على خصائص الأورمات الليفيّة وفعاليتها في آلية التئام الجروح.

تقدم هذه الدراسة فائدة علمية من خلال طريقة بسيطة وسهلة التطبيق نسبياً لعزل الأورمات الليفيّة من جلد الجرذان البالغة واستنباتها من أجل الأبحاث العلمية ويمكن تطويرها في المستقبل على نحو أفضل.

معلومات التمويل :

هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

المراجع:

1. Abbasi, S., Sinha, S., Labit, E., Rosin, N. L., Yoon, G., Rahmani, W., Jaffer, A., Sharma, N., Hagner, A., Shah, P., Arora, R., Yoon, J., Islam, A., Uchida, A., Chang, C. K., Stratton, J. A., Scott, R. W., Rossi, F. M. V., Underhill, T. M., & Biernaskie, J. (2020). Distinct Regulatory Programs Control the Latent Regenerative Potential of Dermal Fibroblasts during Wound Healing. *Cell Stem Cell*, *27*(3), 396-412.e6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.07.008
2. Aumari, A. (2012). Conservation and Cultivation of Murine Embryonic Stem Cells and Develop Into Neural Cells. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, *3*(9), 345–355. https://doi.org/10.21608/jacb.2012.55006
3. Buechler, M. B., Pradhan, R. N., Krishnamurty, A. T., Cox, C., Calviello, A. K., Wang, A. W., Yang, Y. A., Tam, L., Caothien, R., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Arron, J. R., Bourgon, R., Müller, S., & Turley, S. J. (2021). Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*, *593*(7860), 575–579. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03549-5
4. Campbell, T. W. (2015). Appendix A: Stains and Solutions Used in Hematology and Cytology. *Exotic Animal Hematology and Cytology*, 377–381. https://doi.org/10.1002/9781118993705.app01
5. Escada, P. (2018). How to choose the best evidence? *Acta Medica Portuguesa*, *31*(10), 2021. https://doi.org/10.20344/amp.11217
6. EUGENE BELL, BENGT IVARSSON, A. C. M. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *76*, 3,.
7. Gál, P., Toporcer, T., Vidinský, B., Mokrý, M., Grendel, T., Novotný, M., Sokolský, J., Bobrov, N., Toporcerová, S., Sabo, J., & Mozeš, Š. (2008). Postsurgical Administration of Estradiol Benzoate Decreases Tensile Strength of Healing Skin Wounds in Ovariectomized Rats. *Journal of Surgical Research*, *147*(1), 117–122. https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.07.015
8. Henrot, P., Laurent, P., Levionnois, E., Leleu, D., Pain, C., Truchetet, M. E., & Cario, M. (2020). A Method for Isolating and Culturing Skin Cells: Application to Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Melanocytes From Punch Biopsies in Systemic Sclerosis Skin. *Frontiers in Immunology*, *11*(October), 1–12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566607
9. Ichim, T. E., O'Heeron, P., & Kesari, S. (2018). Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, *16*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12967-018-1536-1
10. Jozefczuk, J., Drews, K., & Adjaye, J. (2012). Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Journal of Visualized Experiments*, *64*, 1–5. https://doi.org/10.3791/3854
11. Kheirollah, A., Chashmpoosh, M., Mohammadi, A., Abdovis, N., & Ghasempoor, H. (2016). Isolation and culture of mouse newborn skin fibroblast cells in a simple and inexpensive method. *Pars of Jahrom University of Medical Sciences*, *14*(3), 35–42.
12. Kisiel, M. A., & Klar, A. S. (2019). Isolation and culture of human dermal fibroblasts. *Methods in Molecular Biology*, *1993*, 71–78. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_6
13. Marsh, L. J., Kemble, S., Reis Nisa, P., Singh, R., & Croft, A. P. (2021). Fibroblast pathology in inflammatory joint disease. *Immunological Reviews*, *302*(1), 163–183. https://doi.org/10.1111/imr.12986
14. Miranda, E. G. de, Nascimento, V. P. do, Waisberg, D. R., Sousa, M. W. G. de, Lima, M. F. M. B., Silva, D. dos S., & Waisberg, J. (2011). Inhalation anesthesia equipment for rats with provision of simultaneous anesthetic and oxygen. *Acta Cirurgica Brasileira*, *26*(2), 140–143. https://doi.org/10.1590/s0102-86502011000200012
15. Nilforoushzadeh, M. A., Ahmadi Ashtiani, H. R., Jaffary, F., Jahangiri, F., Nikkhah, N., Mahmoudbeyk, M., Fard, M., Ansari, Z., & Zare, S. (2017). Dermal Fibroblast Cells: Biology and Function in Skin Regeneration. *Journal of Skin and Stem Cell*, *In Press*(In Press), 4. https://doi.org/10.5812/jssc.69080
16. Ravikanth, M., Soujanya, P., Manjunath, K., Saraswathi, T. R., & Ramachandran, C. R. (2011). Heterogenecity of fibroblasts. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, *15*(2), 247–250. https://doi.org/10.4103/0973-029X.84516
17. Rittié, L., & Fisher, G. J. (2005). Isolation and culture of skin fibroblasts. *Methods in Molecular Medicine*, *117*, 83–98. https://doi.org/10.1385/1-59259-940-0:083

18. Rombouts, K., Niki, T., Greenwel, P., Vandermonde, A., Wielant, A., Hellemans, K., De Bleser, P., Yoshida, M., Schuppan, D., Rojkind, M., & Geerts, A. (2002). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-β1-induced fibrogenesis in skin fibroblasts. *Experimental Cell Research*, *278*(2), 184–197. https://doi.org/10.1006/excr.2002.5577
19. Seluanov, A., Vaidya, A., & Gorbunova, V. (2010). Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. *Journal of Visualized Experiments*, *44*, 1–4. https://doi.org/10.3791/2033
20. Siengdee, P., Klinhom, S., Thitaram, C., & Nganvongpanit, K. (2018). Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (Elephas maximus). *PeerJ*, *2018*(1), 1–16. https://doi.org/10.7717/peerj.4302
21. Someya, T., & Amagai, M. (2019). Toward a new generation of smart skins. *Nature Biotechnology*, *37*(4), 382–388. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0079-1
22. Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity: More than skin deep. *Journal of Cell Science*, *117*(5), 667–675. https://doi.org/10.1242/jcs.01005
23. V Sandhu, S., Gupta, S., Bansal, H., & Singla, K. (2012). Collagen in Health and Disease. *Journal of Orofacial Research*, *2*(January 2015), 153–159. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10026-1032
24. Williams, R., & Thornton, M. J. (2020). Isolation of Different Dermal Fibroblast Populations from the Skin and the Hair Follicle. *Methods in Molecular Biology*, *2154*, 13–22. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0648-3_2
25. Zhao, J., Liu, Y. C., Shi, Y. H., Xie, Y. Q., Cui, H. P., Li, Y., Li, X. J., & Ren, L. Q. (2016). Role of rat autologous skin fibroblasts and mechanism underlying the repair of depressed scars. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *12*(2), 945–950. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3442