

مشاهدات في الزرع الأولي لخلايا شبيهة الأرومة الليفية للنوبع (*Laudakia stellio* (Reptilia: Agamidae)

د. عروب المصري¹، م. منال الصالح²، م. بنان الشيخ²

الملخص:

يهدف الزرع الخلوي لخلايا الحرذون النجمي لاختبار مدى حيوية الخلايا وامكانياتها للتضاعف بهدف الحصول على خطوط خلوية لاجراء اختبارات مختلفة عليها. وهو جزء من بحث أوسع يتم من خلاله استخدام الخطوط الخلوية المستحصل عليها من الحرذون النجمي في ترميم الجلد البشري. تم تنفيذ هذا البحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق. تم الزرع الأولي لخلايا شبيهة الأرومة الليفية المأخوذة من (القلب والكبد والمبيض وكيس النطاف والأدمة والصفاق ومنطقة القطع الذاتي في الذيل ومنطقة الحبل الشوكي) لنوبع الحرذون النجمي *Laudakia stellio spp*، وأظهرت الخلايا الناتجة نماذج مختلفة من السلوك. إذ مالت الخلايا المأخوذة من الكبد إلى الاستموات (الموت الخلوي المبرمج) بعد فترة وجيزة لم تتجاوز في أفضل الأحوال 15 يوماً منذ بدء الزرع الأولي، بينما تجاوزت الخلايا المأخوذة من القلب ظروف الزرع بنجاح نسبي ومرت بثلاثة عمليات زرع ثانوي، استطاعت بعدها التكتل استعداداً على ما يبدو لحالة من التمايز النسيجي. استغرقت خلايا القلب والمبيض و كيس النطاف حوالي ثلاثين وخمسين وستين يوماً على التوالي كي تملأ عبوة الزرع، بينما استغرقت بقية أنماط الخلايا وقتاً أطول. أما في الزرع الثانوي للخلايا، فقد استغرقت خلايا القلب 30 يوماً وخلايا المبيض 12 يوماً لتملأ عبوة الزرع من جديد، بينما لم تستطع خلايا كيس النطاف وخلايا بقية النسيج الوصول لمرحلة الزرع الثانوي.

الكلمات المفتاحية: خلايا شبيهة الأرومة الليفية، زرع أولي، *Laudakia* ، Agamidae

stellio

(1) باحث - الهيئة العامة للتقانة الحيوية - دمشق - سورية

(2) مساعد باحث - الهيئة العامة للتقانة الحيوية - دمشق - سورية

Notices on primary cell culture of fibroblast-like cells of *Laudakia stellio* (Reptilia: Agamidae)

Abstract:

Cell culture of *Laudakia stellio* sp aims to evaluate the viability of cells and her ability to double in order to obtain cell lines to conduct various tests.

This study is a part of wider search that aims to utilize cell lines derived from *Laudakia stellio* cells in regenerating human skin.

This study was conducted in the National Commission for Biotechnology (NCBT), Damascus.

The primary cell culture of fibroblast –like cells derived from (heart, liver, ovary, spermatocyte, dermis, Peritoneum, intervertebral autotomy tail area, spinal cord area of *Laudakia stellio* was done. The resulting cells had shown different behavior patterns. Liver cells had apoptotic symptoms and cells at best didn't survive more than 15 days in vitro. Cells taken from the heart however have demonstrated a better adaptation with in vitro conditions as they have passed successfully three subcultures, and exhibited following that a tendency to cluster; apparently in preparation for some kind of cell differentiation and possible tissue formation.

The heart, ovary, and spermatocyte took about 30, 50, 60 days respectively to fill the flask, while the other cell types took longer periods. In subculture, the heart cells took 30 days and the ovary cells 12 days to refill the flask, while the spermatocyte and the rest of other tissue cells were unable to reach the subculture.

Key words: fibroblast-like cells, primary cell culture, Agamidae,

Laudakia stellio.

مقدمة:

يوضح مفهوم زرع الأنسجة إمكانية زرع الأعضاء والأنسجة والخلايا مخبرياً والتي تستخدم في العديد من مجالات العلوم. ويلاحظ من خلال الرعاية الخاصة للخلايا الحيوانية إمكانية تحفيزها للنمو خارج أعضائها أو نسج أعضائها الأصلية.

يمكن زرع الخلايا المعزولة أو الأنسجة أو الأعضاء في الزجاج ضمن وسط زرع يحتوي على العناصر الغذائية وعوامل النمو المناسبة للخلايا، بتأمين درجات حرارة محددة باستخدام حاضنة.

ويشتمل العمل في الزرع الخلوي الأولي (وهو زرع لخلايا مأخوذة من الكائن الحي) على صعوبة تتجلى في كون النجاح ليس تلقائياً، إذ أن إيجاد الظروف المناسبة التي تسمح بنمو خلايا متنوعة المصدر الحيواني والنسيجي وإنضاجها، والحصول على زراعات خلوية تنمو بشكل قابل للتكرار، وتوثيق كل هذا الانجاز، يتطلب الكثير من العمل الشاق (Unchern, 1999).

تم تنفيذ هذا البحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق في العام 2014. وهو جزء من بحث أكبر يتم فيه الاستفادة من الخطوط الخلوية المستحصل عليها من الحرذون النجمي في ترميم الجلد البشري.

تركز العديد من الأبحاث على زرع الخلايا الحيوانية لأغراض تقليدية، يشمل التتميط النووي ودراسة الصبغيات (Ezaz *et al.*, 2008) أو في مجالات حديثة، بهدف دراسة سمة ترميم الأعضاء والنسج (Philipkoski, 2006) أو استثمار ذلك في التطبيقات الصيدلانية (D'Anna, 1994)، أو لأبحاث تمديد العمر، من أجل غزو الفضاء، حيث تملك العديد من خلايا الزواحف إمكانية الاستمرار في العيش والديمومة (Christiansen *et al.*, 2001a)، كما تركز على ظاهرة السبات الاستقلابي الخلوي، المهمة لأبحاث الطب والفضاء (Johnson *et al.*, 2005) والهندسة والوراثة والعلاج الوراثي (Ryan, 2008).

ولأن التيلومير البشرية مماثلة لتلك التي في الزواحف، فإن اكتشاف الآليات المعتمدة على التيلوميراز التي يحتمل استخدامها لتخليد الأنسجة في الزواحف، يمكن أن تكون قابلة

للاستخدام من قبل البشر في إطالة العمر، أو تحسين ترميم الأنسجة خلال رحلات الفضاء الطويلة. وحاولت الدراسات تحديد ما إذا كانت الأدلة تؤيد وجود علاقة بين التيلومير وعمر السلحفاة. حيث أظهرت التجارب قصراً بلغ حوالي 50 % في طول التيلومير في السلحفاة ذات العمر القصير، في النوع *Kinosternon flavescens* لمتوسط أعمار يبلغ 25 عاماً. وأثبتت دراسات الخلايا المزروعة من هذا النوع أن الخلايا مولدة الليف من السلاحف حديثة الفقس تمر بحوالي ضعف عدد الانقسامات بالمقارنة مع السلاحف الطينية ذات ال 25 عاماً.

(Christiansen *et al.*, 2001b)

زرعت خلايا العديد من أنواع الزواحف سابقاً كالأفعى من النوع *Natrix piscator* ، والتمساح من النوع *Crocodylus palustris* (Patel *et al.*, 2009). أما من أنواع فصيلة Agamidae فقد زرعت خلايا النوع *Amphibolurus diemensis* (Stephenson, 1966) والنوع *Tympanocryptis pinguicolla* (Ezaz *et al.*,) (2008) وغيرها من الأنواع، وقد أجريت دراسات على عدد من أنواع الجنس *Laudakia* لتحديد مكان قطع الذيل الذي يعتبر مكاناً مناسباً لاستخلاص الخلايا النشطة في الترميم

ويبدو أن موقع المنطقة التي يقطع فيها الذيل يمكن تحديده إما في منطقة القطع غير الذاتي

(Pygal) او في منطقة القطع الذاتي (Pospygal)(Gordeev et al,2020).

تُزرع خلايا الجنس *Laudakia* والنوع *Laudakia stellio* للمرة الأولى من خلال هذا

البحث، كما أنها المرة الأولى التي يتم فيها زرع خلايا للزواحف في سورية حسب علمنا.

وعلى اعتبار أن استخدام الزواحف شائع في أبحاث الترميم، فمن المهم سبر الأنواع المحلية

للاستفادة منها، وتم استخدام الحرذون النجمي بعد تجربة عدد من الأنواع المحلية وكان

أفضلها من حيث النتائج.

يعد الزرع الأولي عموماً، الوسيلة التي يمكن من خلالها الحصول على الخطوط الخلوية

لأغراض مختلفة (Ryan, 2008). وتمثل هذه التجربة الخطوة الأولى في الزرع الأولي لهذه

الخلايا، بهدف الحصول على خطوط خلوية.

المواد والطرائق:

الأجهزة:

تم استخدام حاضنة زرع خلوي عقيمة، مزودة بغاز ثاني أكسيد الكربون (Shel Lab CO₂)

(Incubator)، ومجهر مقلوب (Nikon Eclipse TS100) مجهز بكاميرا بحثية من النوع

Olympus SP-620 UZ 16 Megapixel، ومجمدة -20 °م، وحجرة أمان حيوي

عقيمة من الدرجة الثانية (Microflow Advanced Biosafety Cabinet class II)،

ومثقلة من النوع Hettich Universal 320R.

الأدوات:

استخدمت عبوات خاصة بالزرع الخلوي (flask) من النوع T25 بغطاء مفلتر (TPP) ،

وأنايبب بلاستيكية عقيمة سعة 15 ملم (TPP) وماصات باستور عقيمة سعة 3 ملم،

وشفرات مخبرية عقيمة.

المواد:

تم استخدام وسط الزرع Low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(LG-DMEM) (Gibco) وهو عبارة عن وسط نمو قليل الغلوكوز مضاف اليه إل

غلوتامين ثابت ومعزز بمصل بقري جنيني (FBS) Fetal Bovine serum

(Invitrogen) بنسبة 10%، ومضادات حيوية بتركيز 100 وحدة/مل بنسيلين

و100ميكروغرام/مل سترينتومايسين بالإضافة الى مضاد فطري (Fungison (Invitrogen)

بتركيز 1 ميكروغرام/مل، وكانت جميع المواد المستخدمة بنقاوة ملائمة للزرع الخلوي.

العينات:

تم التقاط عينة يافعة من الحرذون النجمي (النوع *Laudakia stellio*) من مزرعة أبو جرش

في دمشق بتاريخ 2014-10-22 بعمر حوالي اثنا عشر شهراً أو أكثر بقليل وفي فترة قبل

السبات الشتوي كما في الشكل رقم (1).

طريقة العمل:

تحضير العينة:

تم استئصال الاعضاء المدروسة بعد تشريح الحيوان من الوجه البطني وفتح التجويفين البطني والصدري بالمقص من الأسفل إلى الأعلى، ووضعت الأعضاء كل على حده في شروط عقيمة في أطباق بتري يحوي كل منها 1 مل من وسط الزرع المعايير ثم نُقل إلى حجرة الأمان الحيوي من الدرجة الثانية Biosafety Cabinet class II، تم تقطيع الاعضاء الى قطع صغيرة باستخدام شفرات عقيمة ضمن سائل الزرع داخل حجرة الأمان الحيوي من الدرجة الثانية.

الزرع الأولي:

يتم سحب سائل الزرع الحاوي على الخلايا المفردة السابحة ووضعه في عبوة زرع T25 كما في الشكل رقم (2) حاوية على 5 ملم من وسط الزرع LG-DMEM في حاضنة ثاني أكسيد الكربون بدرجة حرارة 37 درجة مئوية (Ryan, 2008)، وبعد ساعتين وفي درجة الحرارة 37 °م وهي درجة الحرارة المفضلة لخلايا الزواحف (Stephenson, 1966) لوحظ

التصاق الخلايا في قعر عبوة الزرع T25 وتُشاهد تفرش أذرعها في قعر الإناء وتلتصق كما في الشكل رقم (6). تم التقاط الصور تحت التكبير $200 \times$ بالمجهر المقلوب.

الزرع الثانوي (Subculture):

بعد عدة أيام نلاحظ امتلاء عبوة الزرع بالخلايا في طبقة واحدة، نقوم بإضافة التريسين بتركيز 0,05 % المحضر حديثاً إلى وسط الزرع، لفك ارتباط الخلايا بقعر عبوة الزرع، وفك ارتباطها ببعضها البعض، ومن ثم توزيعها على عبوتي زرع، بحيث تتال كل عبوة نصف عدد الخلايا تقريباً، ثم يثبط مفعول التريسين بإضافة المزيد من وسط الزرع، ريثما تستعيد الخلايا إمكانية التصاقها بقعر عبوة الزرع ثانية في الحاضنة على درجة 37 مئوية خلال ساعتين من الزرع الثانوي، ثم يبدل الوسط ثانية بوسط جديد.



الشكل رقم (2) زرع الخلايا في عبوة زرع T25 بعد الحصول على خلايا مفردة



الشكل رقم (1) عينة من النوع *Laudakia stellio*

شروط زرع العينة:

يتم تبديل وسط الزرع مرتين اسبوعياً، بإضافة وسط زرع خلوي محضر مسبقاً في أنابيب

عقيمة خاصة بالزرع الخلوي، بعد تدفئته في حاضنة ثاني أكسيد الكربون بدرجة حرارة 37

°م، بواسطة ماصة باستور 3 ملم بحيث تتم اضافة الوسط الجديد الى عبوة الزرع الخلوي بعد

سحب الوسط القديم. تمت مراقبة الخلايا بشكل دوري باستخدام المجهر المقلوب.

حفظ الخلايا بالتجميد:

يتم تجميد قسم من الخلايا للاحتفاظ بها لوقت آخر تحسباً لخسارة الخلايا لأي سبب كان وخاصة التلوث الفطري والبكتيري، حيث نقوم بفك الخلايا باستخدام أداة لكشط الخلايا وذلك في طور اللوغاريتمي لنمو الخلايا ثم نقل المعلق الخلوي إلى أنابيب تثقيل 15 مل. تم عد الخلايا ثم تثقيلها بسرعة 150g وذلك لمدة 10 دقائق وسحب الطافي ثم أضيف 2 مل من وسط تجميد الخلايا (Sera Lab) إلى كل أنبوب وخلط الراسب برفق ثم نقل معلق الخلايا إلى أنابيب تجميد سعة 1.5 مل المبردة مسبقاً، والموضوعة داخل وعاء يحوي الثلج ومكتوب عليها: اسم الخلايا، تاريخ التجميد؛ بعدها نضع الانابيب في المجمدة بدرجة حرارة -20 °م لمدة ساعة ثم تنقل إلى المجمدة على درجة حرارة -80 °م لمدة 24 ساعة على الأقل ضمن علبة ستريوبور ثم تنقل في النهاية إلى عبوة الآزوت السائل بهدف حفظ الخلايا لمدة طويلة.

النتائج:

نلاحظ أنه بعد زرع عدد محدود من الخلايا في الزرع الأولي لأنماط الخلايا الموجودة في نسج أعضاء الحرذون التالية: (قلب، كبد، مبيض، كيس نطاف، الأدمة، الصفاق، منطقة

القطع الذاتي في الذيل، منطقة الحبل الشوكي)؛ مع تبديل أوساط الزرع تمت مراقبة الخلايا بعد ثمانية أيام لوحظ في خلايا القلب المزروعة وجود خلايا شبيهة الأرومة الليفية تحوي فجوات وخلايا دائرية صغيرة وعدد من الخلايا التي تهاجر من الكتلة الأم المتبقية؛ أما خلايا المبيض المزروعة ففيها خلايا صغيرة بشكل مستعمرات وكذلك الخلايا شبيهة الأرومة الليفية في مستعمرات كما في الشكلين (3) و(4)؛ وخلايا كيس النطاف المزروعة فيها خلايا كبيرة بنواة كبيرة، وخلايا كروية صغيرة، وخلايا شبيهة الأرومة الليفية كما في الشكلين (5) و(6)؛ وفي خلايا الأدمة المزروعة تمت مراقبة خلايا كروية صغيرة متحركة بشدة (ملتصقة في قاعدتها) وخلايا شبيهة الأرومة الليفية كما في الشكل رقم (7)؛ أما في خلايا الصفاق المزروعة فتمت ملاحظة خلايا كروية صغيرة متحركة بشدة وخلايا شبيهة الأرومة الليفية كما في الشكل رقم (8)؛ وفي خلايا منطقة القطع المزروعة لوحظت خلايا كروية صغيرة متحركة بشدة وخلايا شبيهة الأرومة الليفية كما في الشكلين (9) و(10)؛ وأخيراً في خلايا منطقة الحبل الشوكي المزروعة شوهدت خلايا كروية صغيرة متحركة بشدة وخلايا شبيهة الأرومة الليفية كما في الشكلين (11) و(12)؛ استغرقت خلايا القلب والمبيض و كيس النطاف حوالي

ثلاثين، خمسين، ستين يوماً على التوالي كي تملأ عبوة الزرع بخلايا متراصة، بينما استغرقت بقية الخلايا وقتاً أطول لذلك. أما في الزرع الثانوي والذي قسمنا فيه عدد الخلايا إلى النصف، فقد استغرقت خلايا القلب ثلاثون يوماً وخلايا المبيض اثنا عشر يوماً لتملأ عبوة الزرع من جديد كما في الشكلين (13-14)، بينما لم تستطع خلايا كيس النطاف الوصول لمرحلة الزرع الثانوي وكذلك هو الحال بالنسبة لخلايا بقية النسيج.

تم تجميد خلايا الزرع الثانوي للقلب وخلايا الزرع الأولي للمبيض وكيس النطاف بعد شهر من الزرع الأولي. وتم التخلص من خلايا الأدمة والصفاق ومنطقة قطع الذيل ومنطقة الحبل الشوكي بعد شهرين من الزرع الأولي.

لوحظ تجمع الخلايا بشكل أكبر عند زاوية عبوة الزرع وبالقرب من حواف جدران عبوة الزرع، ربما يكون سبب ذلك وجود بنية ثانوية (جدار عمودي) يسهل عملية الالتصاق.

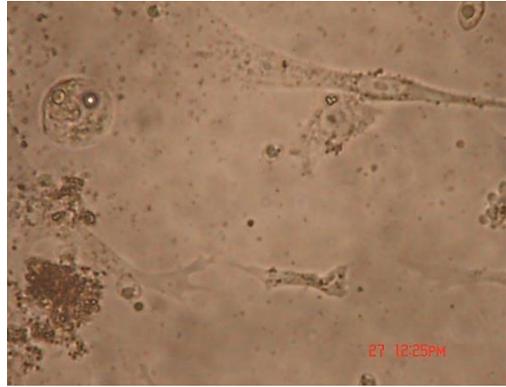
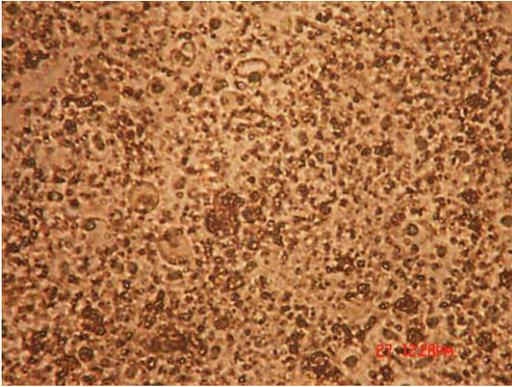
بعد الزرع الثانوي الثالث اتجهت الخلايا المأخوذة من القلب إلى التكتل، ووجد النسيج المتشكل قرب فتحة عبوة الزرع، مما قد يدل على علاقة التنسج المحتمل بالتنفس أو درجة الحموضة.

أظهرت الخلايا المأخوذة من الكبد عدم تحمل، كما في الشكل رقم (15)، حيث شهدت استموات جزء منها (الموت الخلوي المبرمج) كما في الأشكال (16) (17) (18) (بدلالة وجود غشاء خلوي محيط للخلايا المستموتة)(Cowger *et al.*, 1999; Meneses- Acosta *et al.*, 2001) هذا الجزء الذي تعرض للزرع الثانوي، وذلك في اليوم الثالث بعد الزرع الثانوي. أما بقية أنماط الخلايا المزروعة فقد استموتت فيها الخلايا بعد خمسة عشر يوماً من الزرع الأولي.

بالنسبة لخلايا المبيض لوحظ وجود قطرات زيتية استمر وجودها حتى خسارة الخلايا بسبب التلوث الفطري بعد خمسين يوماً.

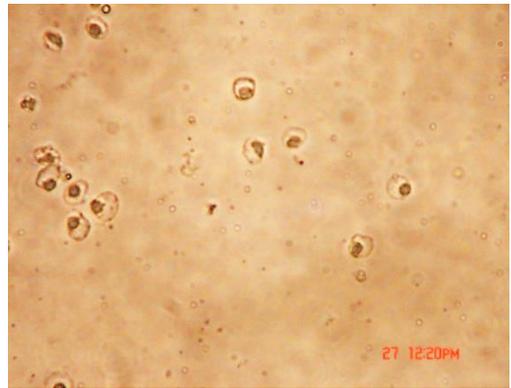
أما بالنسبة لخلايا كيس النطاف لوحظ وجود خلايا دائرية كبيرة ذات نوى كبيرة أيضاً يعتقد أنها أمهات الخلايا المولدة للنطاف والتي حافظت على حيويتها حتى التجميد بعد شهرين من بداية الزرع.

لوحظ أن الخلايا شبيهة الأرومة الليفية المشاهدة في خلايا الأدمة تشبه الخلايا العصبية من حيث الشكل حيث شكّل الذراع الطويل ظاهرة مميزة لتلك الخلايا بالإضافة لوجود الذراع متوسطة الطول.



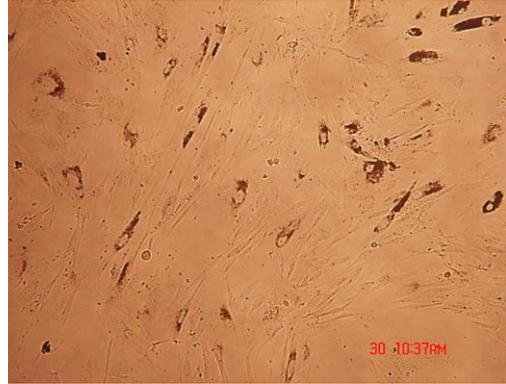
الشكل رقم (4) خلايا من المبيض يظهر فيها مستعمرة كبيرة لخلايا صغيرة وبعض الخلايا شبيهة الأرومة الليفية

الشكل رقم (3) خلايا من المبيض يظهر فيها مستعمرة خلايا صغيرة وخلايا شبيهة الأرومة الليفية



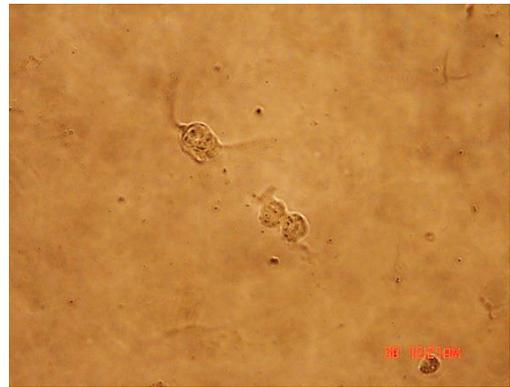
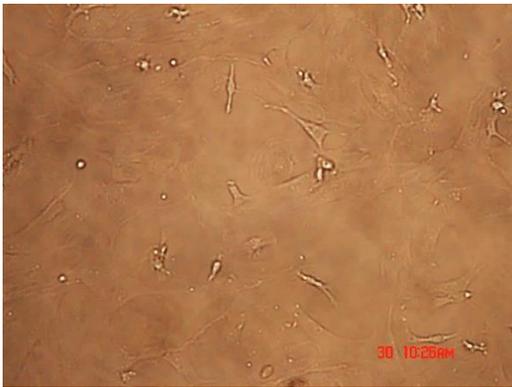
الشكل رقم (6) خلايا كيس النطاف يظهر وجود خلايا صغيرة متحركة خلية تشبه خلايا شبيهة الأرومة الليفية بالإضافة لخلايا شبيهة الأرومة الليفية الكبيرة

الشكل رقم (5) خلايا كيس النطاف تظهر خلايا كبيرة لها نواة كبيرة نسبياً



الشكل (8) خلايا من الصفاق تظهر مستعمرة خلايا شبيهة الأرومة الليفية وخلايا صغيرة

الشكل رقم (7) خلايا من منطقة الأدمة تظهر فيها مستعمرة خلايا شبيهة الأرومة الليفية



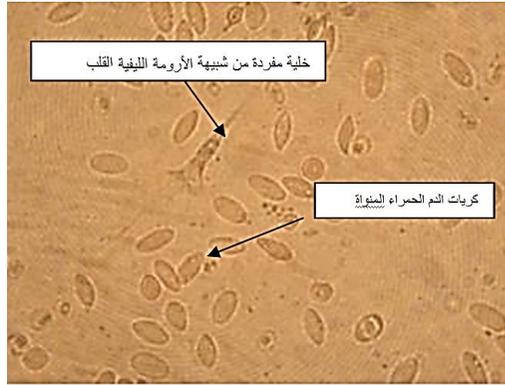
الشكل (10) خلايا من منطقة القطع الذاتي في الذيل منها خلايا صغيرة كروية صغيرة متحركة بشدة وخلايا شبيهة الأرومة الليفية

الشكل (9) خلايا من منطقة القطع الذاتي في الذيل يظهر انقسام الخلايا شبيهة الأرومة الليفية



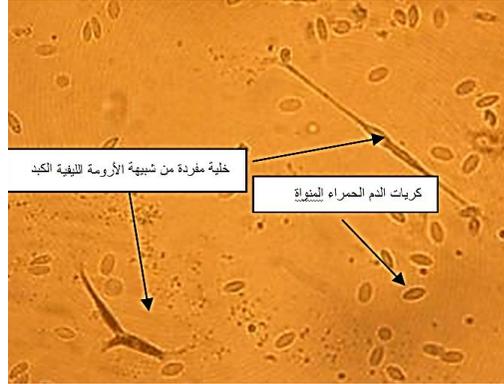
الشكل رقم (12) خلايا من منطقة الحبل الشوكي يظهر فيها خلية شبيهة الأرومة الليفية بالإضافة إلى كريات حمراء (مغزلية الشكل)

الشكل رقم (11) خلايا من منطقة الحبل الشوكي يظهر فيها مستعمرة خلايا شبيهة الأرومة الليفية



الشكل رقم (14) تكاثر خلايا شبيهة الأرومة الليفية من القلب

الشكل رقم (13) خلية مفردة من شبيهة الأرومة الليفية القلب ونلاحظ فيها الاستطالات المميزة



الشكل رقم (16) الانتحار الجماعي Apoptosis لخلايا شبيهة الأرومة الليفية الكبدية تظهر فيها تقطع الخلايا والفجوات المميزة للخلايا المنتحرة

الشكل رقم (15) خلايا شبيهة الأرومة الليفية كبدية (تلاحظ وجود الصباغ المميز للخلايا الكبدية داخل الخلية والاستطالات المميزة)



الشكل رقم (18) خلية شبيهة الأرومة الليفية كبدية مفردة تظهر فيها الفجوات المميزة للخلايا المستموتة وتقطع الخلايا

الشكل رقم (17) خلايا شبيهة الأرومة الليفية كبدية مفردة تظهر فيها الفجوات المميزة للخلايا المستموتة ويتزامن الانتحار في الخلايا المتجاورة

وقد كانت الخلايا الناتجة متطاولة في الحجم ولها ذراع واحدة على الغالب من جهة، وعدة أذرع من الجهة الأخرى، شفاقة على الأغلب في الخلايا القلبية، وذات صباغ مائل إلى البني المصفر في الخلايا الكبدية. كان التصاق الخلايا عموماً سهلاً وسريعاً إلى قعر عبوة الزرع.

المناقشة:

كان الهدف الأساسي من الزرع الخلوي هو اختبار مدى حيوية الخلايا وإمكاناتها للتضاعف بهدف الحصول على خطوط خلوية.

سميت هذه الخلايا: خلايا الأرومة الليفية أو الفيبروبلاست (أو بالأحرى شبيهة الأرومة الليفية)، وهي تبدو أصغر من خلايا الأرومة الليفية في الثدييات، وربما تمتلك خصائص مختلفة ولذلك تسمى شبيهة الأرومة الليفية (Unsicker and Burnstock, 1975).

لوحظ أيضاً وجود خلايا دائرية صغيرة الحجم ذات حركة ذاتية سريعة نسبياً تتجمع على شكل مستعمرات في جميع الزراعات الخلوية الناتجة عن الأنسجة المختلفة وهي شبيهة بالخلايا الجذعية البشرية الصغيرة المتحركة (SMS) Small Mobile Stem-cells المعزولة من

دم الحبل السري البشري (Rahmo *et al.*, 2013).

إن معدل انقسام الخلايا، تتحكم به عملية تنظيم محكمة ترتبط ارتباطا وثيقا مع التمايز، وتحول الأنسجة ونموها. عموما، لا تخضع الخلايا للانقسام ما لم تحصل على الإشارات التي توعد لها بدخول المرحلة النشطة من دورة الخلية (Wyllie *et al.*, 1998). هذا وقد

اختلف ميل الخلايا إلى الاستمرار في الانقسام حسب منشئها، وقد يمكننا عزو ذلك في

الخلايا ذات المنشأ القلبي إلى اقتراب تحولها إلى خلايا عضلية، وفي الخلايا ذات المنشأ الكبدي إلى خلايا مفرزة، وخاصة أن الخلايا ذات المنشأ الكبدي حافظت على لون مصفر داكن، قد يعزى إلى إمكانياتها الإفرازية أو إلى صبغ مميز لهذه الخلايا.

وفي الدراسات المرجعية زرعت خلايا مأخوذة من السلحفاة البحرية الخضراء، من مختلف النسيج، حيث كانت مصابة بورم ليفي حليمي fibropapillomas وقد قدر وقت التضاعف للخلايا خلال عشرين دورة تضاعف، بين 30-36 ساعة، وذلك عندما زرعت على درجة حرارة 30 °م كحرارة فضلى، وتم تشكيل العديد من الخطوط الخلوية بدءاً من هذه الخلايا التي تعاني الأورام (Eckert *et al.*, 1999).

بينما تقدر دورة تضاعف الخلايا المزروعة من أنسجة الحرذون النجمي بحوالي 24 ساعة، وقد يعزى ذلك إلى أن الزرع تم بدرجة حرارة 37 °م، حيث تنتشط خلايا بعض الأنواع لدى زرعها بدرجة حرارة 37 °م كما في الخلايا المأخوذة من جلد الحرادين (Stephenson, 1966)، بينما لا تتحمل خلايا السلاحف البحرية مثل هذه الدرجة (Eckert *et al.*, 1999)، وقد يعزى ذلك إلى أن الأنواع البحرية عموماً ليست معرضة إلى مثل هذه الشدة الحرارية خلال حياتها، أما الأنواع البرية المتكيفة مع البيئات الصحراوية والحرادين على وجه الخصوص فتتحمل مثل هذه الدرجات، بل يزداد نشاطها فيها حسب الملاحظة الحقلية. ويعزى التغير في طول دورة الانقسام الخلوي إلى تأثير درجات الحرارة على عوامل النمو Growth factors والمواد بين الخلوية Extracellular matrices (ECMs) التي تتفاعل سويًا في بيئة النسيج الحركية وينتج عنها فيما ينتج دورة الانقسام الخلوية (Bo *et al.*, 2006).

وقد لوحظ في بعض الأنواع أن التصاق الخلايا في الزرعات الأولية إلى قعر عبوة الزرع كان ضعيفاً، بينما لم نلاحظ وجود مثل هذا السلوك لدى الخلايا المزروعة لدينا (Mansell *et al.*, 1989).

تشير الدراسات إلى أن تضاعف خلايا الزواحف أبطأ من تضاعف خلايا الثدييات أو الطيور (Stephenson, 1966) وبينما توافقت شروط الزرع مع الشروط المستخدمة عادة لزرع خلايا شبيهة الأرومة الليفية البشرية إلا أن أحجامها الملاحظة في هذا البحث كانت أصغر بشكل واضح.

الاستنتاجات والتوصيات:

ظهرت لدينا سلوكيات مختلفة للخلايا طبقاً لمنشئها العضوي، حيث تميل الخلايا ذات المنشأ الكبدي إلى إظهار محدودية العمر الناشئ عن حدود Hayflick بينما تميل الخلايا ذات المنشأ القلبي إلى اللا محدودية مع ميل لاحق إلى التمايز عند اكتناظ الخلايا. حيث أنه ودراسة حدود Hayflick، تحديداً في الخلايا مولدة الليف للزواحف نجد أنها تخضع للشيخوخة وتتضاعف بما يتناسب مع عمر الزواحف المأخوذة منها (Christiansen *et al.*, 2001a)، مما يجعل الخلايا ذات المنشأ القلبي مرشحة للدراسات اللاحقة وخاصة في إمكانية استنباط خطوط خلوية بعد محاولة فهم آلية التمايز فيها والتغلب على هذه العقبة أمام الخطوط الخلوية الممكنة.

شكر وتقدير:

الشكر الجزيل للمخبرية السيدة إيناس نمر والمخبري السيد محمد عمر الشاعر

للمساعدة في الأعمال المخبرية.

المراجع:

1. Bo J, Yang J, Zhu D, Li J, Yao K. 2006. The multiple interactions between growth factors and microenvironment in vivo. **Chinese Science Bulletin** 51(7):761-769.
2. Christiansen J, Henderson E, Budke B, Lynch M, Lu Q, Johnson J. 2001a. A final report of studies of the Hayflick limit in Reptiles, a test of potential immortality. **Proceedings of the Iowa Space Grant Consortium**:10.
3. Christiansen J, Johnson J, Henderson E, Budke B, Lynch M. 2001b. The relationship between telomeres, telomerase, reptilian lifespan, and reptilian tissue regeneration. **Proceedings of the Iowa Space Grant Consortium**:1–10.
4. Cowger NL, O'Connor KC, Hammond TG, Lacks DJ, Navar GL. 1999. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. **Biotechnology and bioengineering** 64(1):14-26.

5. D'Anna J. 1994. Information resources for reptiles, amphibians, fish, and cephalopods used in biomedical research: **DIANE Publishing.**
6. Eckert K, Group ISMTS, Fund WW. 1999. Research and management techniques for the conservation of sea turtles: **IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group.**
7. Ezaz T, O'Meally D, Quinn A, Sarre S, Georges A, Marshall Graves J. 2008. A simple non-invasive protocol to establish primary cell lines from tail and toe explants for cytogenetic studies in Australian dragon lizards (Squamata: Agamidae). **Cytotechnology** 58(3):135-139.
8. Gordeev, D.A., Ananjeva, N.B. and Korost, D.V., 2020. Autotomy and Regeneration in Squamate Reptiles (Squamata, Reptilia): Defensive Behavior Strategies and Morphological Characteristics (Using Computer Microtomography Methods). **Biology Bulletin**, 47(4):389-398.
9. Johnson J, Nettikadan S, Vengasandra S, Lovan S, Muys J, Henderson E, Christiansen J. 2005. Characterization of

testudine melanomacrophage linear, membrane extension processes—Cablepodia—By phase and atomic force

microscopy. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**

41(7):225-231.

10. Mansell JL, Jacobson ER, Gaskin JM. 1989. Initiation and ultrastructure of a reptilian fibroblast cell line obtained from cutaneous fibropapillomas of the green turtle, *Chelonia mydas*.

In vitro cellular & developmental biology 25(11):1062-1064.

11. Meneses-Acosta A, Mendonça RZ, Merchant H, Covarrubias L, Ramírez OT. 2001. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures.

Biotechnology and bioengineering 72(4):441-457.

12. Patel L, Mangalipalli B, Tiwari A, Anand V, Mishra M, Singh K. 2009. Cytogenetic Characterization and Fluorescence in situ Hybridization of (GATA) 10 Repeats on Established Primary Cell Cultures from Indian Water Snake (*Natrix piscator*) and Indian Mugger (*Crocodylus palustris*) Embryos. **Cytogenet Genome Res**

127:287-296.

13. Philipkoski K. 2006. MID- How animal research leads to knowledge about human regeneration. **Grow Your Own Limbs.**
14. Rahmo A, Elwi M, Saleh M, Almasri A. 2013. Introducing a Novel Human Stem Cell with Exceptional Characteristics: Small, Mobile Stem Cells (SMS). **Journal of Life Sciences and Technologies** Vol 1(1).
15. Ryan J. 2008. Introduction to Animal Cell Culture. Corning Incorporated, Life Sciences, Chelmsford St.
16. Stephenson N. 1966. Effects of temperature on reptilian and other cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology** 16(3):455.
17. Unchern S. Basic techniques in animal cell culture; 1999. p 19-20.
18. Unsicker K, Burnstock G. 1975. Myoid cells in the peritubular tissue (Lamina propria) of the reptilian testis. **Cell and Tissue Research** 163(4):545-560.

19. Wyllie A, Donahue V, Fischer B, Hill D, Keeseey J, Manzow S.

1998. Apoptosis and Cell Proliferation: Boehringer Mannheim

GmbH, **Biochemica**. 138 p.

