



جامعة الموصل  
كلية الطب البيطري

## دور الخلايا الجذعية في اصلاح التغيرات المرضية الناجمة عن الانتان المحدث تجريبياً في الجرذان

احمد محمد علي السيدية

أطروحة دكتوراه فلسفة

الأمراض البيطرية / الطب البيطري

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتورة

هناء خليل إسماعيل حمودي

دور الخلايا الجذعية في اصلاح التغيرات المرضية الناجمة عن  
الانتان المحدث تجريبياً في الجرذان

أطروحة تقدم بها  
أحمد محمد علي السيدية

الى  
مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل  
في اختصاص الطب البيطري/الأمراض البيطرية  
وهي جزء من متطلبات شهادة الدكتوراه فلسفة

بإشراف  
الاستاذ المساعد الدكتورة  
هناء خليل إسماعيل حمودي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ﴿١﴾ خَلَقَ  
الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿٢﴾ اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ ﴿٣﴾  
الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿٤﴾ عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ  
يَعْلَمُ ﴿٥﴾

صدق الله العظيم  
العَلَق

### إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الأطروحة قد جرى بإشرافي في جامعة الموصل، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه فلسفة في إختصاص الطب البيطري / أمراض بيطرية.

#### التوقيع

المشرف: أ.م.د. هناء خليل اسماعيل حمودي

التاريخ: / /

### إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن هذه الأطروحة الموسومة بـ " دور الخلايا الجذعية في اصلاح التغيرات المرضية الناجمة عن الانتان المحدث تجريبياً في الجرذان " تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الأطروحة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

#### التوقيع:

الاسم: أ.م. د. هديل عبد الحليم داؤد

التاريخ: / /

### إقرار رئيس فرع الأمراض والدواجن

بناءً على التوصيتين المقدمتين من قبل المشرف والمقوم اللغوي، أرشح هذه الأطروحة للمناقشة.

#### التوقيع:

الاسم: أ. د. صموئيل اوشعنا يوحنا

التاريخ: / /

### إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي ورئيس فرع الأمراض وأمراض الدواجن، أرشح هذه الأطروحة للمناقشة.

#### التوقيع:

الاسم: أ. د. ظافر محمد عزيز

التاريخ: / /

## شكر وتقدير

الحمد لله الذي يخضع لقدرته جميع الخلق ، ولعظمته يخشع من يركع ويسجد ، ولطيب مناجاته يسهر العابد ولا يرقد ، ولطلب ثوابه يزرع العالم ويحصد ، والصلاة والسلام على سيدنا وحبينا محمد وعلى اله وصحبه وسلم .

فلا يسعني وأنا أضع اللمسات الأخيرة لما قد بدأت به ، إلا أن أتقدم بجزيل شكري وتقديري إلى مشرفتي الفاضلة الدكتورة (( هناء خليل اسماعيل )) لتوجيهاتها السديدة والقيمة ولعطائها الدائم بكل ما تمتلك من روح التعاون والتوجيه الصحيح ، واقدر فيها حرصها وعلميتها على إظهار رسالتي بأكمل وجه فجزاها الله عني كل خير ، كما أتقدم بشكري وتقديري إلى رئاسة جامعة الموصل وإلى عمادة كلية الطب البيطري وإلى فرع الأمراض وأمراض الدواجن وجميع أساتذتي وزملائي الأفاضل في الفرع .

ومن دواعي الوفاء والعرفان بالجميل أن أتقدم بالشكر والامتنان والتقدير إلى زوجتي العزيزة وبناتي ، كما أتقدم بفاثق الشكر والتقدير إلى عائلتي الكريمة لوالدي الغالي وأمي الحبيبة اللذين كانا سبباً في نجاحي فلهما الفضل في كل هدف أحققه ، وبدعائهما لي الفضل الكبير في تسهيل أمري ، وأتقدم بالشكر وجزيل العرفان إلى إخوتي وأختي العزيزة لتشجيعهم المتواصل لي ولتحملهم معي عناء هذا الجهد .

واعتزافاً بذوي الفضل عليّ ، اقدم شكري وتقديري لكل من مد لي يد العون في سبيل إتمام هذا البحث واخص بالذكر كل من السيد عامر حسين طه ، والدكتور اسامه حازم اسماعيل والدكتورة مي ذنون يونس . كما أتقدم بالشكر إلى زملائي في الدراسات العليا الذين ساندوني طوال فترة الدراسة ، وأتقدم بخالص شكري إلى زملائي كل من (( الدكتور محمد غسان والدكتورة شهباء خليل ابراهيم )) لطيب زمالتهم وتعاونهم المشرف في أثناء فترة إعداد البحث ، وفي النهاية أشكر كل من قدم لي عوناً وأثار لي درباً .

والله ولي التوفيق

الباحث

الصفحة	الموضوع	الرقم
<b>الفصل الأول</b>		
<b>المقدمة</b>		
1	المقدمة	.1
3	الهدف من البحث	1.2
<b>الفصل الثاني</b>		
<b>استعراض المراجع</b>		
4	تعريف الخلايا الجذعية	2.1
4	مميزات الخلايا الجذعية	2.2
5	تصنيف الخلايا الجذعية	2.3
5	الخلايا الجذعية كاملة القدرات	2.3.1
6	الخلايا الجذعية وافرة القدرات	2.3.2
6	الخلايا الجذعية متعددة القدرات	2.3.3
6	الخلايا المولدة الاولية	2.3.4
7	طرق الحصول على الخلايا الجذعية	2.4
9	انواع الخلايا الجذعية	2.5
9	الخلايا الجذعية الجنينية	2.5.1
11	الخلايا الجذعية البالغة	2.5.2
12	خاصية اللدونة في الخلايا الجذعية البالغة	2.6
14	الخلايا الجذعية لنقي العظم	2.7
15	الخلايا الجذعية المكونة للدم	2.7.1
17	الخلايا الجذعية للحمية	2.7.2
19	منشأ الخلايا الجذعية للحمية	2.8
20	العلاج بالخلايا الجذعية	2.9
22	الاستخدامات العلاجية للخلايا الجذعية في الطب البيطري	2.10
25	الإنتان	2.11
25	مرضية الإنتان	2.11.1
31	طرق إحداث الإنتان تجريبياً	2.11.2
33	الخلايا الجذعية للحمية والإنتان	2.12
34	تأثيرات مضادة للالتهاب	2.12.1
36	تأثيرات مضادة لموت الخلايا المبرمج	2.12.2
37	تأثيرات تكوين اوعية دموية جديدة	2.12.3
37	تحفيز وتنشيط الخلايا الجذعية الكامنة	2.12.4
38	تأثيرات التحوير المناعي	2.12.5
41	البحوث والدراسات حول الخلايا الجذعية في العراق	2.13

الفصل الثالث		
المواد وطرائق العمل		
43	الاجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة	3.1
45	الحيوانات المختبرية	3.2
45	ظروف زراعة وتنمية الخلايا الجذعية	3.3
46	تحضير محاليل الزرع	3.4
46	تحضير وسط الزرع DMEM – High glucose	3.4.1
47	تحضير محلول دارى الفوسفات الملحي منزوع ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم	3.4.2
47	تحضير محلول انزيم الترسين – EDTA	3.4.3
47	تحضير محلول ملون التريبان الازرق	3.4.4
48	عزل الخلايا الجذعية للحمية من نقي عظم الجرذان	3.5
49	حصاد الخلايا الجذعية للحمية وحساب اعدادها	3.6
50	إحداث الإنتان تجريبياً بطريقة ربط الاعور وثقبه	3.7
52	سحب الدم	3.8
52	المعايير المستخدمة في الدراسة	3.9
52	فحوصات صورة الدم	3.9.1
52	قياس مستوى البروتين التفاعلي – سي	3.9.2
53	دراسة التغيرات المرضية	3.9.3
54	التحليل الاحصائي	3.10
55	محاور الدراسة	3.11
55	المحور الاول : عزل الخلايا الجذعية للحمية من نقي عظم الجرذان	3.11.1
55	المحور الثاني : إحداث الاذى في اعضاء وانسجة الجسم باستخدام الإنتان متعدد الجراثيم والمحدث تجريبياً عن طريق ربط الاعور وثقبه	3.11.2
56	المحور الثالث : دراسة تأثير زرع الخلايا الجذعية للحمية في الحد من او تقليل الافات المرضية الناجم عن الإنتان	3.11.3

<b>الفصل الرابع</b>		
<b>النتائج</b>		
57	المحور الاول : عزل الخلايا الجذعية للحمية من نقي عظم الجرذان	4.1
63	المحور الثاني : إحداث الاذى في أعضاء وأنسجة الجسم باستخدام الإنتان متعدد الجراثيم والمحدث تجريبيا عن طريق ربط الاعور وثقبه	4.2
63	معدل البقاء على قيد الحياة	4.2.1
64	العلامات السريرية	4.2.2
64	التغيرات المرضية العيانية	4.2.3
64	التغيرات المرضية النسجية	4.2.4
78	المحور الثالث : دراسة تأثير زرع الخلايا الجذعية للحمية في الحد من او تقليل الافات المرضية الناجمة عن الإنتان	4.3
78	معدل البقاء على قيد الحياة	4.3.1
79	التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي - سي	4.3.2
82	التغيرات المرضية العيانية	4.3.3
82	التغيرات المرضية النسجية	4.3.4
<b>الفصل الخامس</b>		
<b>المناقشة</b>		
100	المناقشة	5
100	المحور الاول : عزل الخلايا الجذعية للحمية من نقي عظم الجرذان	5.1
105	المحور الثاني : إحداث الاذى في اعضاء وأنسجة الجسم باستخدام الإنتان متعدد الجراثيم والمحدث تجريبيا عن طريق ربط الاعور وثقبه	5.2
112	المحور الثالث : دراسة تأثير زرع الخلايا الجذعية للحمية في الحد من او تقليل الافات المرضية الناجمة عن الإنتان	5.3
<b>الفصل السادس</b>		
<b>الاستنتاجات والتوصيات</b>		
120	الاستنتاجات	6.1

121	التوصيات	6.2
المصادر		
122	المصادر العربية	
123	المصادر الانكليزية	
	الخلاصة باللغة الانكليزية	

### قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
.1	جدول رقم (1) : التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي في جردان المجاميع المختلفة بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان التجريبي.	83
.2	جدول رقم (2): التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي في جردان المجاميع المختلفة بعد 3 أيام من إحداث الإنتان التجريبي.	84

## قائمة الأشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1	يوضح لدونة الخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظم	13
2	يوضح انواع الخلايا الجذعية المتواجدة في نقي العظام	14
3	التأثيرات المناعية المحورة للخلايا الجذعية للحمية	39
4	مراحل عملية اجراء عملية Cecal ligation and puncture لإحداث الإنتان Sepsis	49
5	مزرعة خلايا نقي عظم في بداية الزرع توضح مختلف خلايا نقي العظم والتي تكون معلقة في الوسط الزرعي	59
6	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد 24 ساعة من الزرع الاولي ، يوضح حدوث استطالة والتصاق لبعض الخلايا داخل الوسط الزرعي	59
7	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد 3 أيام من الزرع الاولي ، يبين التصاق لبعض الخلايا الزرع النسجي والتي اتصفت بشكلها المغزلي ، في حين ان باقي الخلايا ظلت طائفة في المعلق الخلوي	60
8	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد 3 أيام من الزرع الأولي ، يبين حدوث التصاق العديد من الخلايا ذات الشكل المغزلي بقاع دورق الزرع النسجي الشبيه بخلايا الارومة الليفية مع وجود بروزات بروتوبلازمية احادية او ثنائية القطب ممتدة من جسم الخلية	60
9	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 3 أيام من الزرع الأولي ، يلاحظ وجود طبقتين من الخلايا هما الطبقة الملتصقة والطبقة الطافية	61
10	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 3 أيام من الزرع الاولي ، يلاحظ زيادة في تكاثر الخلايا الجذعية للحمية مع قلة في خلايا نقي العظم الاخرى	61
11	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 7 أيام من عملية الزرع الاولي تكوين مستعمرات خلوية.	62
12	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 7 أيام من عملية الزرع الاولي ، يلاحظ تكوين مستعمرات والتي هي عبارة عن تجمعات من الخلايا الجذعية للحمية والتي يطلق عليها وحدات المستعمرات المكونة لارومات الليفية	62

63	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 7 أيام من الزرع الاولي ، توضح الشكل المغزلي للخلايا الجذعية اللحمية مع تواجد لخلايا جذعية لحمية صغيرة الحجم وكروية الشكل	13
63	مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 14 يوم من الزرع الاولي ، توضح تكون طبقة محتشدة من الخلايا الجذعية	14
64	معدل البقاء على قيد الحياة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة السيطرة الموجبة sham ومجموعة الإنتان المحدث تجريبياً.	15
69	مقطع عياني لجرذ بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح احتقان ونزف في الاعضاء المختلفة ، مع انتفاخ للمعدة	16
69	مقطع عياني لجرذ بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح انتفاخ ، مع ملاحظة وجود بقع نخرية على الكبد	17
69	مقطع عياني لجرذ بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح احتقان الطحال وجود بقع نزفية على الرئة مع تضخم الكبد ووجود مناطق نخرية على سطحه فضلاً عن وجود التصاقات ليفينية على المعدة والامعاء	A18
70	مقطع عياني لجرذ من مجموعة السيطرة ، يوضح عدم وجود تغيرات مرضيه على كل من الرئة و الكبد ، فضلاً عن المعدة والامعاء	B18
71	مقطع نسجي لرئة جرد من مجموعة السيطرة sham ، يظهر فيه النزف بين الاسناخ الرئوية ، مع ارتشاح طفيف للخلايا الالتهابية ، فضلاً عن النفاخ H&E X	19
71	مقطع نسجي لكبد جرد من مجموعة السيطرة sham ، يظهر توسع الجيبانيات مع تقجي ونخر الخلايا الكبدية H&E X	A 20
71	مقطع نسجي لكبد جرد من مجموعة السيطرة ، يظهر الشكل الطبيعي لنسيج الكبد.	B 20
72	مقطع نسجي لكلية جرد من مجموعة السيطرة sham ، يظهر تورم الخلايا الظهارية المبطنة للنببيات الكلوية وتتخر البعض الاخر منها H&E X	21
73	مقطع نسجي لكبد جرد بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح احتقان الوريد المركزي مع تكف للخلايا الالتهابية حوله ، فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية H&E X	22

73	مقطع نسجي لكبد جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح احتقان شديد للاوعية الدموية في الباحة البابية ، مع تكفف للخلايا الالتهابية ، والنخر التجلطي الشديد للخلايا الكبدية H&E X	23
73	مقطع نسجي لكبد جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد في الخلايا الكبدية ، مع وضوح ظاهرة الموت المبرمج للخلايا الكبدية . H&E X	24
74	مقطع نسجي لكبد جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح النزف بين الخلايا الكبدية ، مع وضوح ظاهرة الموت المبرمج للخلايا الكبدية مع النخر الشديد H&E X .	25
74	مقطع نسجي لكبد جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح احتقان الاوعية الدموية في الباحة البابية مع ارتشاح للخلايا الالتهابية فضلا عن النخر الشديد للخلايا الكبدية . H&E X	26
74	مقطع نسجي لكبد جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد للخلايا الكبدية مع وجود الخثرة الدموية . H&E X	27
75	مقطع نسجي لرئة جرد بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح احتقانات للاوعية الدموية ، مع وضوح ظاهرة النفاخ الرئوي فضلاً عن ارتشاح للخلايا الالتهابية . H&E X	28
75	مقطع نسجي لرئة جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح وجود نخر وتوسف لظاهرة القصيبات الهوائية مع ملاحظة التثخن في جدار الوعاء الدموي . H&E X	29
75	مقطع نسجي لرئة جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح تخن لجدار الاسناخ الرئوية بسبب ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية مع التثخن الشديد لجدار الوعاء الدموي فضلاً عن فرط تنسج لظاهرة القصيبات الهوائية H&E X	30

76	مقطع نسجي لرئة جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح وجود ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية حول القصيبات الهوائية وحول الاوعية الدموية مع وجود تتخن شدد لجدار الوعاء الدموي فضلاً عن النخر والتوسف للخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية H&E X	31
76	مقطع نسجي لرئة جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح وجود خثرة دموية داخل الوعاء الدموي . H&E X	32
76	مقطع نسجي لكلية جرد بعد ساعة 24 من إحداث الإنتان ، يوضح وجود النخر للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية وكذلك وضوح ظاهرة الموت المبرمج لهذه الخلايا فضلاً عن النزف . H&E X	33
77	مقطع نسجي لكلية جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح وجود ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية مع ملاحظة وجود تتخن في جدار الوعاء الدموي . H&E X	34
77	مقطع نسجي لكلية جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح وجود نخر ونزف في الكبيبة الكلوية مع ملاحظة النخر الشديد للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية . H&E X	35
77	مقطع نسجي لكلية جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح وجود الخثرة الدموية داخل الوعاء الدموي مع ارتشاحات للخلايا الالتهابية . H&E X	36
78	مقطع نسجي لقلب جرد بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية ، ومع وجود نخر في الخلايا العضلية القلبية فضلاً عن الوذمة بين الالياف العضلية . H&E X	37
78	مقطع نسجي لقلب جرد بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد في عضلة القلب مع وجود الوذمة بين الالياف العضلية القلبية H&E X	38
78	مقطع نسجي لقلب جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد للخلايا العضلية القلبية مع الوذمة فضلاً عن وجود تتخن في جدار الوعاء الدموية ووجود الخثرة الدموية H&E X	39

79	40	مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح الارتشاح الكثيف للخلايا الالتهابية في الطبقة المخاطية وتحت المخاطية مع وجد تثخن في الطبقة العضلية. H&E X
79	41	مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح وجود تنكس مخاطيني للخلايا المبطنة للزغابات والغدد المعوية مع ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية. H&E X
79	42	مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد مع التوسف للخلايا الظهارية المبطنة للزغابات المعوية. H&E X
80	43	مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح احتقان مع تثخن في جدار الوعاء الدموي مع وجد نخر في الطبقة العضلية. H&E X
81	44	معدل البقاء على قيد الحياة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة الإنتان المحدث تجريبياً ، ومجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية. H&E X
89	45	مقطع عياني لجرذ بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية ، يوضح احتقان الاوعية الدموية في غشاء الخلب.
89	46	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 7 ايام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد للخلايا الكبدية مع وجود خثرة دموية حديثة التكوين في الوريد المركزي. H&E X
90	47	مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 7 ايام من إحداث الإنتان ، يوضح تثخن جدار الاسناخ الرئوية بسبب ارتشاح الخلايا الالتهابية مع وجود خثرة دموية حديثة التكوين وتثخن لجدار الوعاء الدموي. H&E X
90	48	مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 7 ايام من إحداث الإنتان ، يوضح النخر الشديد لعضلة القلب مع تثخن لجدار الوعاء الدموي بين الالياف العضلية فضلاً عن وضوح الوذمة. H&E X
90	49	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان للاوعية الدموية في الباحة البابية مع ارتشاح للخلايا الالتهابية حوله. H&E X

91	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الجيبانويات مع ملاحظة الموت المبرمج للخلايا الكبدية. H&E X	50
91	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الوريد المركزي مع ملاحظة ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية حول الوريد المركزي وفي الباحة البابية. H&E X	51
91	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الوريد المركزي مع ملاحظة ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية حول الوريد المركزي . H&E X	52
92	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 3 ايام من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية في الباحة البابية. H&E X	53
92	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 7 ايام من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الوريد المركزي مع ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية. H&E X	54
92	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 7 ايام من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح الارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية على شكل تجمعات في الباحة البابية مع وجود نخر للخلايا الكبدية . H&E X	55
93	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 14 ايام من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية في الباحة البابية مع النخر الشديد للخلايا الكبدية. H&E X	56
93	مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداثا الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان للوعية الدموية مع تكفف الخلايا الجذعية حولها فضلاً عن النفاخ. H&E X	57

93	58	مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 7 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح التثخن الشديد للاسناخ الرئوي بسبب ارتشاح الخلايا الالتهابية مع فرط تنسج ظاهرة القصيبات الهوائية. H&E X
94	59	مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 14 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية يوضح التثخن الشديد لجدار للاوعية الدموية واحتقانها مع نخر وتوسف لظاهرة القصيبات الهوائية ووضوح النفاخ في الاسناخ الرئوية. H&E X
94	60	مقطع نسجي لكلىة جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح النزف بين النبيبات الكلوية مع انتفاخ الخلايا الظهارية المبطنه لهذه النبيبات. H&E X
94	61	مقطع نسجي لكلىة جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح الموت المبرمج لبعض الخلايا الظهارية المبطنه للنبيبات الكلوية مع ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيهة بالارومات الليفية . H&E X
95	62	مقطع نسجي لكلىة جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية اللحمية الشبيهة بالارومات الليفية بين النبيبات الكلوية. H&E X
95	63	مقطع نسجي لكلىة جرد بعد مرور 7 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح نخر الخلايا الظهارية المبطنه للنبيبات الكلوية مع ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية اللحمية الشبيهة بالارومات الليفية. H&E X
95	64	مقطع نسجي لكلىة جرد بعد مرور 14 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تثخن شديد لجدار الاوعية الدموية واحتوائه على الخثرة الدموية. H&E X
96	65	مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الاوعية الدموية الشعرية بين الالياف العضلية القلبية مع ارتشاح للخلايا الالتهابية وبخاصة العدلات واللمفية وبين الالياف العضلية فضلاً عن وجود الودمة. H&E X

96	مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تتكس زجاجي Hyalinization ونخر للخلايا العضلية القلبية ، فضلاً عن الوذمة والنزف بين الالياف العضلية مع ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيه بالارومات الليفية. H&E X	66
96	مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 7 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيه بالارومات الليفية بين الالياف العضلية مع وجود النخر في الخلايا العضلية القلبية فضلاً عن الوذمة. H&E X	67
97	مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 14 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيه بالارومات الليفية بين الالياف العضلية مع وجود النخر في الخلايا العضلية القلبية. H&E X	68
97	مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 12 يوم من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تتخن في جدار الاوعية الدموية مع وجود الخثرة فضلاً عن وجود النخر في الخلايا العضلية القلبية و الوذمة. H&E X	69
97	مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 24 ساعة من إحداث الإنتان ، يوضح تواجد لمستعمرات الجراثيم في جدار الاسناخ الرئوية. H&E X	70
98	مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح تواجد لمستعمرات الجراثيم في الكبيبة الكلوية. H&E X	71
98	مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان ، يوضح تواجد لمستعمرات الجراثيم . صبغة كرام المحورة للنسيج	72
99	مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تواجد لأعداد قليلة من مستعمرات الجراثيم ، فضلاً عن تلون للخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين ان باقي النسيج تلون باللون الاصفر . صبغة كرام المحورة للنسيج	73
99	مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 3 أيام من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تلون للخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين ان باقي النسيج تلون باللون الاصفر . صبغة كرام المحورة للنسيج	74

## قائمة الرموز والمصطلحات

الرمز	المعنى
Hematopoietic stem cells	HSCs
Mesenchymal stem cells	MSCs
Colony-forming unit fibroblast	CFU-F
Embryonic Stem Cell	ESC
Systemic inflammatory response syndrome	SIRS
Multiple Organ Failure	MOF
Toll –Like receptors	TLR
Lipopolysaccharide	LPS
Tumor necrotic factor	TNF
Interlukine	IL
Nitric oxide	NO
Monocyte chemo-attractant protein	MCP
Transforming growth factor	TGF
Gut-associated lymphoid tissue	GALT
Cecal ligation and puncture	CLP
Disseminated intravascular coagulation	DIC
major histocompatibility complex	MHC
vascular endothelial growth factor	VEGF
Fibroblast Growth Factors	FGF
Hepatocyte growth factor	HGF
Angiopoietin	Ang-1
Dulbecco 's Modification Eagle's Media	DMED
Fetal bovine serum	FBS
C- Reactive protein	CRP
Intercellular adhesion molecules	ICAM-1
Reactive oxygen species	ROS
Neutrophils extracellular traps	NETs
Prostaglandins	PGE2
Vascular cell adhesion molecules	VCAM-1
Granulocyte colony stimulating factor	G-CSF

## الخلاصة

تم في هذه الدراسة عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجرذان البيض ، مع إمكانية تتميتها خارج الجسم الحي باستخدام الطريقة التقليدية التي تعتمد على قابلية الخلايا الجذعية اللحمية على الالتصاق بقاع دوارق الزرع النسجي ، إذ تم استخدام الوسط الزرع الخاص (DMEM) والمزود بمصل الجنين البقري وفي ظروف زرعية تمثلت بدرجة حرارة 37 م° ونسبة 5% من غاز ثنائي اوكسيد الكربون .

خلال المراحل الاولية من زراعة نقي العظم ، أمكن تمييز نوعين من الخلايا وهي الخلايا الملتصقة في بقاع دورق الزرع النسجي والمتمثلة بالخلايا الجذعية اللحمية ، والنوع الثاني من الخلايا هي الخلايا الطافية والمتمثلة بالخلايا الجذعية المكونة للدم ، فضلاً عن باقي انواع خلايا نقي العظم المختلفة التي تم التخلص منها من خلال التغيير المستمر للوسط الزرع خلال مراحل تغذية وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية .

تميزت الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي عظم الجرذان بشكلها المغزلي الشبيه بالارومات الليفية مع وجود بروزات بروتوبلازمية احادية اوثنائية القطب ممتدة من جسم الخلية الجذعية ، مع قابليتها على التجمع وتكوين مستعمرات خلوية التي يطلق عليها خلايا الارومات الليفية المشتقة من الوحدة المكونة للمستعمرات ، وتم دراسة الخواص المظهرية للخلايا الجذعية اللحمية من خلال فحصها تحت المجهر المقلوب.

تم احداث الانتان تجريبياً في الجرذان عن طريق استخدام نموذج جراحي يطلق عليه ربط الاعور وتقبه الذي يسبب حدوث الخمج متعدد الجراثيم . اذ اظهرت نتائج الدراسة حدوث انخفاض في معدلات البقاء على قيد الحياة للجرذان الى (65%) بعد 24 ساعة من احداث الانتان تجريبياً ، واستمر هذا الانخفاض في معدلات البقاء على قيد الحياة ليصل الى (0 %) بعد مرور 7 ايام من احداث الانتان . كذلك سبب الانتان المحدث تجريبياً تغيرات في كل من صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي سي في الجرذان بعد مرور 24 ساعة و 3 ايام من احداث الانتان ، تمثلت بحدوث انخفاض معنوي في العدد الكلي لكريات الدم البيض وفي اعداد الصفيحات الدموية وكذلك في نسبة الخلايا اللمفية ، في حين لوحظ حدوث ارتفاع معنوي في مستوى البروتين التفاعلي سي . كما واوضحت نتائج الدراسة وجود تغيرات مرضية في بعض اعضاء وانسجة الجرذان وبشكل خاص في كل من نسيج الرئة والكبد والكلية والقلب والامعاء

تمثلت هذه التغيرات المرضية بحدوث احتقانات شديدة للاوعية الدموية واحتواء البعض منها على خثر دموية ، ولوحظ وجود النخر الشديد لخلايا هذه الانسجة مع ارتشاح شديد للخلايا الالتهابية فضلاً عن وجود مستعمرات جرثومية .

أظهرت نتائج حقن الخلايا الجذعية عن طريق الوريد الذيلي للجرذان التي تم احداث الانتان فيها تجريبياً عن طريق ربط الاعور وتقبه ، حدوث تحسناً في معدلات البقاء على قيد الحياة ، حيث اظهرت نتائج الدراسة ارتفاع في معدلات البقاء على قيد الحياة للجرذان الى (90%) بعد 24 ساعة من احداث الانتان تجريبياً وحقن الخلايا الجذعية . كذلك أظهرت نتائج الدراسة حدوث تحسن في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي سي ، حيث لوحظ زيادة في العدد الكلي لكل من كريات الدم البيض والصفائح الدموية وفي نسبة الخلايا اللمفية ، فضلاً عن انخفاض في مستوى البروتين التفاعلي سي .

نسيجياً تم ملاحظة حدوث تحسن للاعضاء والانسجة المتضررة ، تمثلت بانخفاض في شدة نخر الخلايا فضلاً عن انخفاض في ارتشاح الخلايا الالتهابية ، مع ملاحظة تواجد للخلايا الجذعية اللحمية التي ظهرت بشكل مغزلي شبيه بالارومات الليفية وبشكل كثيف حول الاوعية الدموية ، وبشكل خاص في كل من نسيج الكبد والكلية .

## الفصل الأول

### المقدمة Introduction

شهد العالم في السنوات الأخيرة اهتماماً بالغاً بتقنيات الخلايا الجذعية واستخداماتها التطبيقية ، وعلى الرغم من أن الدراسات والبحوث لاتزال في بدايات تطورها ، إلا انها تشكل أملاً واعداً لعلاج العديد من الحالات المرضية سواءً في الانسان أم في الحيوان ( *Gade et al., 2012* ) وتعد الخلايا الجذعية اللبنة الاساسية التي يتكون منها جسم الكائن الحي وهذا ما دفع الباحثين والعلماء إلى البحث في امكانية استخدام هذه الخلايا الجذعية في اصلاح وتجديد الانسجة والاعضاء المتضررة ، وهذا ما يطلق عليه بالطب التجديدي *Regenerative Medicine* وهذا ما سبب ثورة في مجال الطب سواءً في مجال الطب البشري او الطب البيطري ( *Kolios and Moodley , 2013* ).

ماهي الخلايا الجذعية ؟ هي نوع خاص من خلايا الجسم تمتاز بكونها خلايا غير متخصصة وغير مكتملة الانقسام لا تشبه أي خلية متخصصة ، إلا أنها لديها القدرة على الانقسام والتكاثر وبشكل غير محدود لتعطي طلائع *progenitors* للعديد من خلايا الجسم المختلفة ( *Gattegno-Ho et al., 2012 ; Larijani et al., 2012* ) ، وهناك أنواع عدة من هذه الخلايا الجذعية التي يمكن تصنيفها بحسب مصادرها أو حسب قدرتها وفعاليتها على الانقسام ، إلا أنه بشكل عام يوجد نوعان رئيسيان من الخلايا الجذعية هما :

1- الخلايا الجذعية الجنينية *Embryonic Stem cells*

2- الخلايا الجذعية البالغة *Adult Stem cells*

ويفضل بعض العلماء التركيز على الخلايا الجذعية الجنينية نظراً لقدرتها على الانقسام بشكل غير محدود مع تمايزها إلى كل أنواع خلايا الجسم المختلفة ، في حين يفضل البعض الاخر من العلماء التركيز على الخلايا الجذعية البالغة ( وهو المستخدم حالياً ) لعدم رفضها من قبل الجسم وعدم إثارتها أي مشاكل اخلاقية أو دينية ( *Kolios and Moodley , 2013* ) .

تعد الخلايا الجذعية اللحمية (Mesenchymal stem cells (MSCs) واحدة من أهم أنواع الخلايا الجذعية البالغة وتمتاز بكونها خلايا غير متخصصة تمتلك قدرات خاصة في الانقسام والتجدد لتكوين خلايا جذعية جديدة ، فضلاً عن قدرتها على التمايز والتخصص لأنواع مختلفة من خلايا الجسم مثل الخلايا العظمية والغضروفية وخلايا القلب والعضلات والخلايا العصبية ، وهذا ما زاد من أهميتها في الأبحاث العلمية ، وتستخدم حالياً هذه الخلايا الجذعية اللحمية بما يعرف بالعلاج الخلوي (Cell therapy (Elman *et al.*, 2014 , Ankrum ) and Karp , 2010) ، إذ إن هنالك العديد من الحالات المرضية التي يكون سببها الرئيسي هو تعطل الوظائف الخلوية وتحطم أنسجة الجسم ، وتلعب الخلايا الجذعية اللحمية دوراً مهماً في علاج وتجديد الأنسجة والخلايا المتضررة من خلال العديد من الآليات التي تمتلكها ، مثل قدرتها على الهجرة إلى مواضع الإذى النسيجي والتمايز إلى أنواع الخلايا المتضررة (MOK *et al.*, 2013) ، مع قدرتها على محاربة الالتهاب وقابليتها على التحوير المناعي وتنظيم استجابة الجهاز المناعي من خلال تحرير وتحفيز إفراز العديد من عوامل النمو Growth factors ، والساييتوكينات المضادة للالتهاب التي تلعب دوراً مهماً في آلية الاستجابة الجسمية (Javaregowda *et al.*, 2014 ; Murphy *et al.*, 2013)

يعرف الانتان على أنه متلازمة سريرية خطيرة تنتج من تفاعل معقد ما بين المضيف والمخيمات المرضية ، ويتميز باستجابة التهابية جهازية غير منتظمة وبصورة غير مسيطر عليها وتحدث نتيجة عدوى جرثومية وظهور الجراثيم وذيقاتها في الدم والأنسجة (Lima *et al.*, 2011) ، إذ إن الآلية التي تحدث بها حالة الانتان تكون مرتبطة بالوسائط الالتهابية وبالرغم من أن نظام مناعة الجسم والاستجابة الالتهابية تكون مصممة للتغلب على الخمج ، إلا أن التحرير الغير منتظم وبكميات كبيرة من هذه الوسائط الالتهابية والمفرزة من قبل الخلايا المناعية التي تحفزت وخاصة العدلات ، البلعميات والخلايا وحيدة النواة بإنتاج كميات كبيرة من بادئات الالتهاب Pro-inflammatory mediators (مثل البروستاغلاندينات والثرومبوكسان A2 ، فضلاً عن الساييتوكينات مثل TNF ، IL-1 و IL-6 ) مسببة طور التهابي مفرط Hyper-inflammatory phase ، إذ أن هذه العاصفة من الوسيطات الالتهابية

مع الزيادة المفرطة في الاستجابة الالتهابية تسبب ضرراً نسيجياً أكبر مما يحدثه الغزو الجرثومي (Dejager et al., 2011) .

ونظراً لقلّة الدراسات والبحوث حول استخدام الخلايا الجذعية اللحمية في علاج وترميم الأنسجة المتضررة من حالات مرضية ، لذا ارتأت الدراسة الحالية على تسليط الضوء في استخدام الخلايا الجذعية اللحمية في اصلاح وتقليل الاذى الناجم عن الانتان المحدث تجريبياً في الجرذان ومن خلال الاهداف الآتية :

1. عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الجرذان وتنميتها خارج الجسم الحي . In Vitro .

2. احداث الانتان Sepsis تجريبياً في الجرذان باستخدام نموذج ربط الاعور وثقبه Cecal Ligation and Puncture

3. معرفة معدلات البقاء على قيد الحياة في الجرذان المحدث بها الانتان تجريبياً

4. دراسة التغيرات المرضية العيانية و النسجية للجرذان المحدث بها الانتان تجريبياً وبشكل خاص الرئة والكبد والكلية والقلب والامعاء.

5. معرفة معدلات البقاء على قيد الحياة في الجرذان التي احدث بها الانتان تجريبياً ثم حقنت بالخلايا الجذعة اللحمية .

6. دراسة الصورة الدموية ومستويات البروتين التفاعلي سي للجرذان التي احدث بها الانتان ثم حقنت بالخلايا الجذعية اللحمية .

7. دراسة تأثير حقن الخلايا الجذعية اللحمية للحد من التغيرات المرضية الناجمة عن الانتان في الاعضاء (الرئة والكبد والكلية والقلب والامعاء).

## الفصل الثاني

### استعراض المراجع Literatures Review

#### Definition of the stem cells

#### 1. 2 تعريف الخلايا الجذعية

تعتبر الخلية الجذعية هي الخلية الأولية التي ينشأ منها جسم الكائن الحي ، وعرف العلماء الخلايا الجذعية اعتماداً على سلوك هذه الخلايا داخل الجسم الحي وخارجه . فمثلاً عرف العالم Morrison وجماعته (1997) الخلايا الجذعية على أنها خلايا غير متخصصة وغير متميزة وغير مكتملة الانقسام ، لاتبه أي خلية متخصصة في الجسم ولها القابلية على الانقسام لمدة غير محدودة وغالباً ما تكون طول فترة حياة الكائن الحي عند توافر الظروف المناسبة . كما يمكن لهذه الخلايا الجذعية التمايز إلى العديد من خلايا الجسم المختلفة التي تمتلك وظائف متخصصة التي تُكون انسجة وأعضاء الجسم المختلفة . أما الباحث Grove وجماعته (2004) فقد عرف الخلايا الجذعية على أنها خلايا لها القابلية على التكاثر والتجدد الذاتي Self-renew مع إنتاج اعداد كبيرة من الذرية المتميزة وظيفياً .

#### Properties of Stem cell

#### 2. 2 مميزات الخلية الجذعية

تتميز الخلايا الجذعية عن سائر أنواع الخلايا في الجسم بثلاث خصائص رئيسة هي :

- 1) خلايا غير متخصصة Unspecialized : واحدة من المميزات الأساسية للخلايا الجذعية أنها لا تمتلك أي من الصفات الوظيفية المتخصصة ، أي أنها خلايا غير متميزة ، ويمكن أن تنشأ منها خلايا متميزة ومتخصصة عندما تتوفر الظروف الفسلجية والمختبرية المناسبة (Li and Ikehara , 2013 ; Augello *et al.*, 2010) .
- 2) التجدد الذاتي Self-renewal : تتميز الخلايا الجذعية بكونها تستطيع ان تجدد نفسها ذاتياً ولمدة طويلة داخل الجسم وخارجه ، والتجدد الذاتي هو عبارة عن انقسام الخلية

المتماثلة الذي يؤدي إلى تكوين خلايا ابوية جديدة التي تحتفظ بنفس القدرة على التطور إلى الخلايا الجذعية الأصلية ( Ma *et al.*, 2013 ; panno, 2010 )

(3) التمايز Differentiation : يعرف التمايز على أنه العملية التي تكتسب فيها الخلايا خصائص وظيفية جديدة من خلال تحولها إلى شكل مظهري جديد ( Tarnowski and Sieron , 2006 ) . إن تمايز وتخصص الخلايا الجذعية يكون مسيطر عليه عن طريق اشارات Signals داخلية وخارجية ، الإشارات الداخلية Internal Signals يكون مسيطر عليها من قبل جينات الخلية الجذعية ، أما الإشارات الخارجية External Signals فتتضمن مواد او وسيطات كيميائية تفرز من قبل خلايا أخرى ( Passier and Mummery, , 2003 ) .

## Stem Cells Classification

## 3. 2 تصنيف الخلايا الجذعية

تصنف الخلايا الجذعية بالاعتماد على درجة تمايزها إلى خمسة انواع هي :

(Fernandez Vallone *et al.*, 2013 ; ; Kolios and Moodley , 2013 ; Tarnowski and Sieron , 2006 )

### 1.3. 2 الخلايا الجذعية الكاملة القدرات Totipotent Cells

هي اكثر الخلايا الجذعية غير المتميزة ، التي تتكون خلال الساعات والإيام الأولى بعد عملية الإخصاب ، اذ يبدأ انقسام البويضة المخصبة إلى مجموعة من الخلايا التي تمتلك القدرة الكاملة لتكوين جميع أنواع الخلايا اذ يمكن لكل خلية منها اذا ما زرعت في رحم اثنى أن تنشئ جنيناً كاملاً مع الأنسجة المدعمة له من المشيمة والإغشية المحيطة به ( Kochar , 2004 ; Rossant , 2001 ) .

### 2.3.2 الخلايا الجذعية الوافرة القدرة Pluripotent Cells

تمتلك هذه الخلايا القابلية على تكوين أنواعاً مختلفة من الخلايا التي تتطور لتكون الطبقات الجرثومية Germ layers الثلاثة التي ينشأ منها جميع أنواع خلايا الجسم وهي الإديم الظاهر Ectoderm ، الإديم المتوسط Mesoderm والإديم الداخلي Endoderm ، ومثال على هذه الخلايا هي الخلايا الجذعية المشتقة من الكيسة الإريمية Blastocyst ، إذ يمكن لهذه الخلايا أن تكون المنشأ لجميع الخلايا الجسمية في الكائن الحي ، لكنها لا تستطيع تكوين كائن حي بمفردها لأنها غير قادرة على تكوين الأنسجة الداعمة للجنين وهي الحبل السري والمشيمة فضلاً عن الإغشية المحيطة (De miguel *et al.*, 2010) .

### 3.3.2 الخلايا الجذعية متعددة القدرة Multipotent Cells

وهي خلايا فعالة لها القدرة على أن تنشئ أنواعاً مختلفة من الخلايا الجسمية المتخصصة والتمايزة لتشكل نسيجاً أو عضواً معيناً ، ومثال على هذا النوع من الخلايا الجذعية هي الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic Stem Cells ، التي تعمل على تكوين وإنتاج كل أنواع خلايا الدم (Ratajczak *et al.*, 2012).

### 4.3.2 الخلايا المولدة الأولية Progenitor Cells

وهي الخلايا التي تنشأ من انقسام الخلية الجذعية ، وتسمى أيضاً بالخلايا البادئة أو خلايا الأسلاف ، وتتقسم الخلية المولدة بسرعة لإنتاج مجاميع خلوية متخصصة و تمايزة تتكامل لتشكيل النسيج الخلوي ، وتعد هذه الخلية تمايزة جزئياً ، لأنها تؤدي دوراً وسيطاً قبل تحقيق حالة التمايز الكامل ، ومثال عليها الخلايا الجذعية العضلية التي تتمايز إلى خلايا عضلية ، وكذلك الخلايا الرئوية النوع الثاني والموجودة في الإنسان الهوائية التي تستطيع التمايز إلى النوع الأول من الخلايا الرئوية (Kolios and Moodley , 2013).

## 2. 4 طرق الحصول على الخلايا الجذعية

يمكن الحصول على الخلايا الجذعية بواسطة طرق عدة ، أهمها :

1. **طريقة الدكتور جيمس ثومسون Thomson-James** ، يتم عزل الخلايا الجذعية الجنينية Embryonic Stem Cells من نوع الوافرة القدرات مباشرةً من كتلة الخلايا الداخلية للجنة في مرحلة الكيسة الأريمية Blastocyst derived inner cell mass ، إذ يتم عزل كتلة الخلايا الداخلية وتنميتها في اوساط مختلفة في المختبر لتكوين خطوط خلوية من الخلايا الجذعية الجنينية التي تعتبر أفضل انواع الخلايا الجذعية لقدرتها غير المحدودة على التكاثر والانقسام ، فضلا عن تكوين جميع أنواع الانسجة المختلفة (Thomson *et al.* , 1998).

2. **طريقة الدكتور جير هارت Gear - Hart** ، إذ تم عزل الخلايا الجذعية من الانسجة الجنينية التي يتم الحصول عليها من الاجنة المجهضة في أي مرحلة من مراحل الحمل ، ويتم استخلاص هذه الخلايا التي تسمى بالخلايا الجذعية الجنينية Fetal Stem cells ، من اعضاء الاجنة مثل الكبد ، الجهاز الهضمي ، الجلد وهي اقرب إلى الخلايا البالغة في شكلها وسلوكها) (Pera *et al.*, 2000 ; Shablott *et al.* 1998).

3. **طريقة الاستنساخ Cloning** : ، وتسمى أيضاً بتقنية Somatic Cell Nuclear Transfer ، إذ يتم نقل نواة خلية جسدية إلى بويضة مفرغة من نواتها لتكون خلية جديدة ، وتتميز بأنها ذات قدرة كاملة على تكوين كائن حي كامل ، وعند وصولها إلى مرحلة الكيسة الأريمية ، يمكن من خلالها استخراج كتلة الخلايا الداخلية ، وتستخدم هذه الطريقة بالاستنساخ العلاجي إذ تمتاز الخلايا الجذعية الناتجة عن هذه العملية بكونها متطابقة جنينياً مع الفرد الذي اخذت منه النواة وزرعت في

البويضة ، وهذه الطريقة تساعد في الحد من مشكلة رفض الأنسجة من قبل الجهاز المناعي (Panno , 2010)

4. المشيمة والحبل السري ، يتم الحصول على الخلايا الجذعية متعددة القوى من المشيمة والحبل السري بعد الولادة مباشرة ، وفي الوقت الحاضر يوجد بنوك للخلايا الجذعية التي يتم الحصول عليها من دم المشيمة والحبل السري للأطفال بعد الولادة وهذه الخلايا تساهم في إعادة بناء خلايا الدم والجهاز المناعي للمرضى المصابين بأمراض الدم مثل سرطان الدم Leukemia ، فقر الدم Anemia ، كما تستخدم في علاج أمراض الجهاز العصبي كالشلل الدماغى ، والزهايمر ، وغيرها من الأمراض ( Ali and Al-Mulla , 2012 )

5. الحصول على الخلايا الجذعية من أنسجة وأعضاء الأشخاص البالغين ، إذ تتواجد الخلايا الجذعية البالغة في أعضاء وأنسجة بالغة مثل نخاع العظم ، الجلد ، النسيج الدهني ، الجهاز الهضمي والجهاز العصبي. ( Ayatollahi *et al.*, 2012 ; sell , 2004 )

## Types of Stem cell

## 5. 2 أنواع الخلية الجذعية

يوجد نوعين من الخلايا الجذعية هما :

## Embryonic Stem Cell (ESC)

## 1.5. 2 الخلية الجذعية الجنينية

من المعروف أن جسم الجنين يبدأ بخلية واحدة وهي الزيجة Zygote التي تتكون بعد عملية اخصاب البيضة ، وتعتبر هذه الخلية خلية جذعية مع قدرة كامنة تمكنها من التمايز إلى كل الأنسجة المكونة للجنين ، فضلاً عن الأنسجة الخارجية الداعمة للجنين مثل المشيمة وفي اليوم الرابع بعد التلقيح وبعد انقسامات عدة تبدأ هذه الخلايا بتكوين الكيسة الأريمية Blastocyst ، التي تتكون من طبقتين هما ، الطبقة الخارجية التي تعرف بالارومة الإغذائية Trophoblast وهي التي تكون المشيمة والأنسجة الداعمة للجنين (Kumar *et al.*, 2009 ; Torrisi , 2007 ; Bongso and Tan,2005) .

اما الطبقة الثانية فتعرف بكتلة الخلايا الداخلية Inner cells mass ، التي تتكون من خلايا تستطيع أن تكون جميع أنسجة الجسم ما عدا المشيمة والأنسجة الداعمة ، ويتم الحصول على الخلايا الجذعية الجنينية من كتلة الخلايا الداخلية التي تمتاز بكونها غير متميزة ، وذات قدرة وافرة مع قابلية غير محدودة على التمايز خارج الجسم الحي ، وفي ظروف مناسبة إلى كل أنواع الخلايا المشتقة من الطبقات الجرثومية الثلاث وهي الطبقة الخارجية Ectoderm ، الوسطى Mesoderm والطبقة الداخلية Endoderm

(Kolios and Moodley , 2013 ; Rambhalta *et al.*, 2003 ; Thomson *et al.*, 1998)

تم عزل هذه الخلايا الجنينية لأول مرة في بداية الثمانينات من القرن الماضي عن طريق مجموعة من الباحثين الذين استطاعوا عزل هذه الخلايا الجذعية من أريمة أجنة الفئران وتم تنميتها خارج الجسم الحي مع المحافظة على هذه الخلايا وادامتها لأجيال عديدة وبحالة غير

متميزة لشهور عديدة دون أن تفقد قدرتها على النمو وذلك عن طريق زراعتها بوجود طبقة الخلايا المغذية مثل الأرومات الليفية الجنينية Embryonic Fibroblasts.

(Axelrod, 1984 ; Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981)

هنالك خصائص ومميزات يجب توافرها في الخلية الجذعية الجنينية:

1. أن يكون مصدرها من خلايا الكتلة الخلوية الداخلية في مرحلة الكيسة الأريمية .
  2. لديها القدرة على تجديد نفسها ذاتياً self – renewing بالانقسام ولمدة غير محدودة .
  3. لديها عدد ثابت وكامل من الصبغيات الكروموسومية.
  4. قدرتها على التكاثر إلى أجل غير مسمى.
  5. أن تكون وافرة القدرة ، أي انها تستطيع التمايز إلى جميع انواع الخلايا للطبقات الثلاثة الأديم الظاهر ، الأديم المتوسط والأديم الداخلي ، ولها القدرة على التحول إلى أي نوع من الخلايا الوظيفية المتخصصة ، مما يجعل الخلايا الجذعية عناصر اساسية في العلاج والطب التجديدي الحديث .
  6. أن تقضي معظم حياتها في الطور البيني Interphase وبشكل خاص في المرحلة S والتي هي مرحلة تضاعف الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA في دورة انقسام الخلية ، وهذا يحدث فقط حينما يغيب عنها طور G1-S الذي يعمل كنقطة تفتيش او ضبط لدورة الانقسام .
  7. يجب امتلاكها مستويات عالية من انزيم Telomerase الذي يساعدها على الانقسام باستمرار وبشكل نهائي ، وكذلك انزيم Alkaline phosphates وهو انزيم يتم افرازه وبصورة كبيرة جدا من الخلايا الجذعية الجنينية ، إذ يعد هذا الانزيم احد الواسمات التي تستخدم في تشخيص هذه الخلايا الجذعية .
- (Zhoa *et al.*, 2011 ; Evans , 2011 ; Francesco Bifari *et al.*, 2010 ; )  
(Kumar *et al.*, 2009).

## 2.5. 2 الخلايا الجذعية البالغة

## Adult stem cells

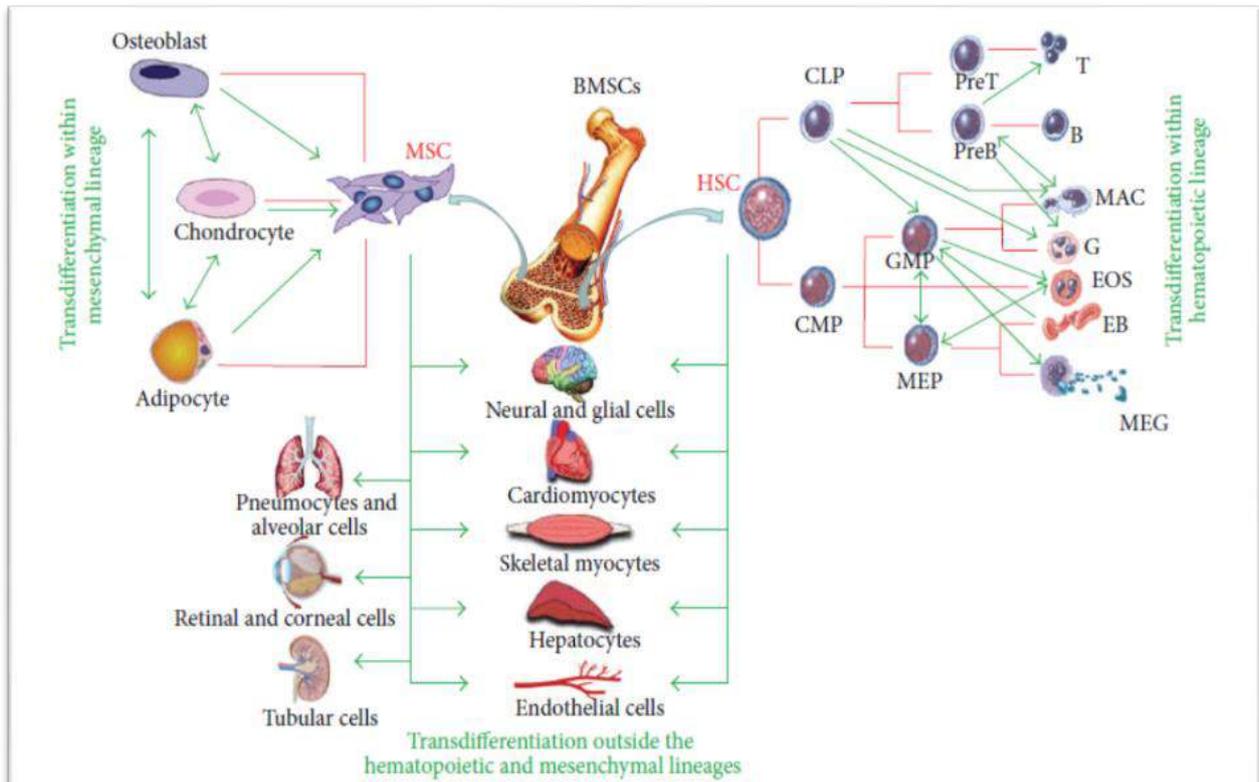
ركزت الدراسات الحديثة على اثبات قابلية الجسم على اصلاح وتجدد أنسجة واعضاء الجسم المختلفة بسبب الامراض والتقدم بالعمر ، وخاصة بعد توافر العديد من الأدلة على وجود الخلايا الجذعية البالغة في أنسجة واعضاء الجسم المختلفة ( Gattegno-Ho *et al.*, 2004 ; Sell , 2012 ) والخلايا الجذعية البالغة هي خلايا غير متخصصة تتواجد في الأنسجة المتخصصة مثل نقي العظم ، والدم المحيطي ، والجهاز العصبي المركزي ، والكبد والبنكرياس وغيرها من انسجة الجسم المختلفة (Avasthi *et al.*, 2008) ، وبين Roobrouck وجماعته (2008) أن الخلايا الجذعية البالغة كغيرها من الخلايا الجذعية تشترك بصفتين رئيسيتين هما قابليتها على التجدد الذاتي وقدرتها على التمايز إلى انواع مختلفة من خلايا الجسم الوظيفية ، لذلك تلعب هذه الخلايا الجذعية دوراً رئيساً في المحافظة على حالة التوازن Homeostasis ، إذ تعد كنظام اصلاح وترميم عن طريق امداد اعضاء وانسجة الجسم البالغة بالخلايا التي تموت كنتيجة طبيعية لانتهاء عمرها المحدد في النسيج واستبدال الخلايا عند حصول الإذى او الجروح ، إذ تتواجد هذه الخلايا الجذعية في كل الأنسجة المتجددة ، وتنقسم لتجديد نفسها وكذلك تكوين انواع من الخلايا الوسطية التي يطلق عليها باللائع Precursor أو الإسلاف Progenitors ( Avasthi *et al.*, 2008 ; Sell , 2004 ) . فضلاً عن كونها خلية متعددة القدرات ، خاصة في الحالات المرضية من خلال امتلاكها لخاصية اللدونة Plasticity فهي لا تستطيع فقط أن تتحول إلى خلايا متخصصة مطابقة تماماً لخلايا النسيج المتواجدة فيه ، ولكنها ايضاً تستطيع أن تتحول إلى خلايا متخصصة من أي نوع من خلايا الطبقات الجرثومية الثلاثة (Wagers and Weissman , 2004) .

## 2. 6 خاصية اللدونة في الخلايا الجذعية البالغة Plasticity of Adult stem cells

أوضح العديد من الباحثين وحتى وقت قريب ، أن الخلايا الجذعية الموجودة في الأنسجة والاعضاء المتخصصة يمكنها أن تتمايز إلى خلايا النسيج الذي تتواجد فيه فقط ، إلا أن الدراسات والبحوث الحديثة أثبتت قدرة الخلايا الجذعية في نسيج معين أن تتمايز إلى أنواع أخرى من خلايا نسيج ثاني غير الذي نشأت منه ، وهذا يعني انها تتمايز إلى خلايا نسيجية مشتقة من طبقة جرثومية أخرى ( ; Jiang *et al.*, 2002 ; Catacchio *et al.*, 2013 ; Mckinney – Freeman *et al.*, 2002) تعرف هذه الخاصية في الخلايا الجذعية البالغة على توليد انواع من خلايا متميزة في نسيج غير الذي اشتقت منه باللدونة (Ogawa , 2010 ; Howell and Yoder , 2003 ; Tarnowski and Sieron ,2006 ; ). كما وتم استخدام مصطلحات أخرى في البحوث العلمية مثل التمايز غير التقليدي Unorthodox differentiation ، او مصطلح التمايز المتحول Trans-differentiation (Anderson *et al.*, 2001) .

حاول الباحثون فهم آلية اللدونة في الخلايا الجذعية البالغة ، وقاموا بوضع نظريات حول هذه الخاصية ، اوضحت النظرية الاولى أنه يوجد في أنسجة الجسم المختلفة نوع شائع من الخلايا الجذعية الذي يتواجد في بيئة محيطة بها تمكنه من التمايز إلى انواع مختلفة من الخلايا المتخصصة ، أما النظرية الأخرى فبينت حدوث عملية ارتداد Revert لهذه الخلايا الجذعية البالغة ورجوعها إلى مرحلة مشابه للخلايا الجذعية الجنينية وهذا يمكنها من القيام بخاصية اللدونة او أن هذه الخلايا الجذعية البالغة تتحول مباشرة إلى خلايا جذعية لأنواع أخرى من الخلايا (Wei *et al.*, 2000) .

توجد العديد من الأدلة على لدونة الخلايا الجذعية البالغة وكما هو موضح بالشكل (1) فمثلاً بإمكان الخلايا الجذعية المكونة للدم التحول والتمايز وتحت ظروف معينة ، إلى خلايا متخصصة وفي نسيج مختلف تماماً في نشأته الجنينية ، وهي مختلفة تماماً عن خلاياها الأساسية التي تكونها في نقي العظم وهي خلايا الدم إذ اوضحت الدراسات قدرة هذه الخلايا الجذعية المكونة للدم على التمايز إلى خلايا كبدية (Peterson *et al.*, 1999) ، أو إلى خلايا عضلية (Jackson *et al.*, 2001 ; Ferrari *et al.*, 1998) ، أو حتى إلى خلايا عصبية (Bjornson *et al.*, 1999) . أو أن يحدث العكس ، أي أن تتحول الخلايا الجذعية العصبية إلى خلايا دموية (Brazelton *et al.*, 2000) ، ومن المعروف بان خلايا الدم تنشأ من طبقة الأديم المتوسط في حين أن الخلايا الجذعية العصبية تنشأ من طبقة مغايرة وهي طبقة الأديم الظاهر .



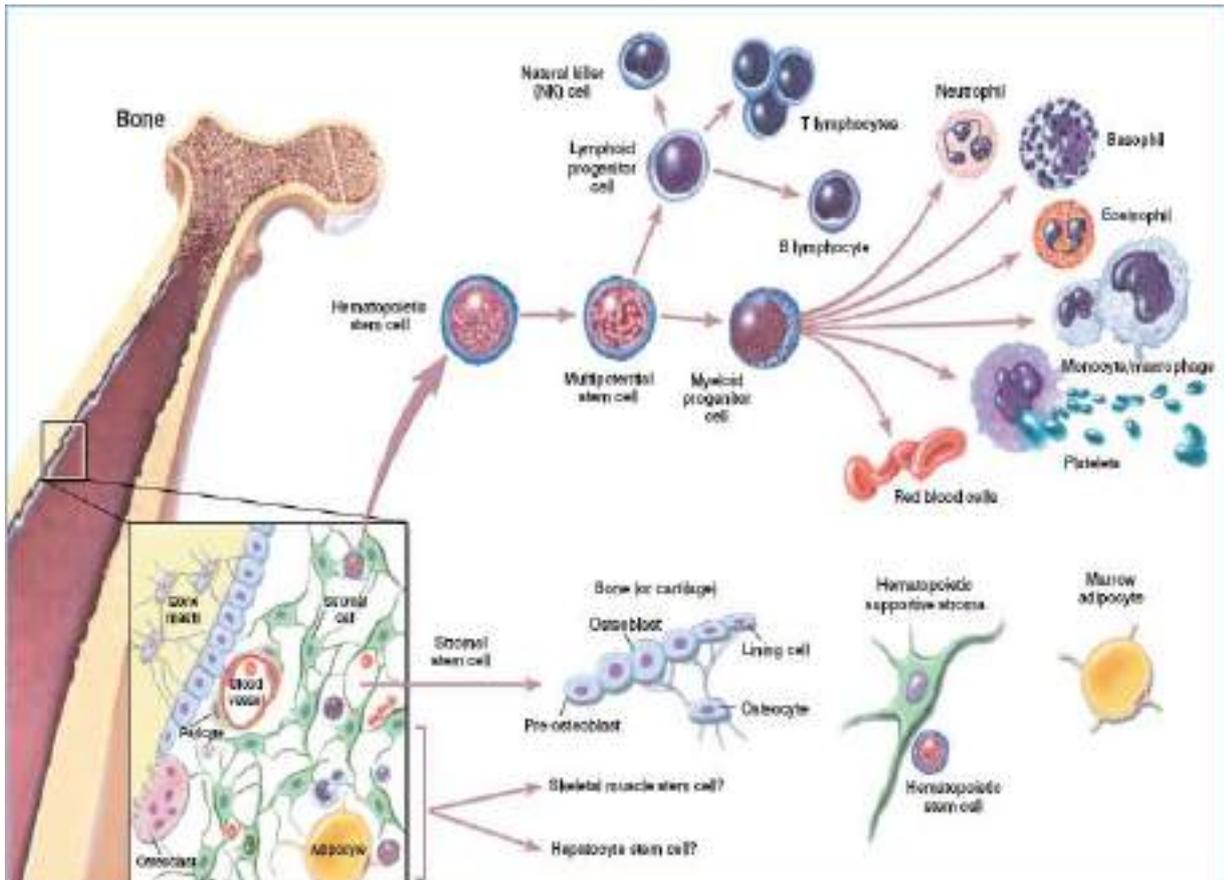
شكل (1) : يوضح لدونة الخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظم Catacchio *et al.*, 2013

إن تمايز الخلايا الجذعية البالغة لنسيج ما إلى خلايا متخصصة لنسيج آخر ليس شرطاً أن يحدث بين نسيجين قد نشأ من طبقتين جنينيتين مختلفتين ، إذ أنه قد يحدث أيضاً بين نسيجين نشأ من نفس الطبقة الجنينية ومثال على ذلك الخلايا الجذعية البالغة والموجودة في نقي العظم التي ينشأ من الطبقة الجنينية الوسطى ، تتمايز إلى خلايا العضلات الهيكلية وخلايا القلب وخلايا الكبد ، وهي جميعها من أنسجة نشأت من الطبقة الجنينية الوسطى ( Filip *et al.*, 2005 ; Clarke *et al.*, 2000 ) .

## Bone Marrow Stem cells

## 7. 2 الخلايا الجذعية لنقي العظم

نقي العظم هو نسيج اسفنجي لين يوجد داخل العظام من بينها عظام الإضلاع الصدرية والجمجمة والعمود الفقري وعظام الحوض، وأن وظيفته الأساسية هي إنتاج خلايا الدم ، ويحتوي نقي العظم على نوعين أو أكثر من الخلايا الجذعية البالغة وكما هو مبين بالشكل (2).



شكل (2) : يوضح أنواع الخلايا الجذعية المتواجدة في نقي العظام Domen *et al.*, 2001

وهي الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic stem cells وهي المسؤولة عن نمو وإنتاج سلفيات progenitors لخلايا الدم المختلفة التي تضم الأنواع الثلاثة الأساسية وهي التي تحمل الأوكسجين والغذاء إلى أنسجة الجسم وكذلك الصفائح الدموية التي تساعد على تخثر الدم والتئام الجروح ( Granick *et al.*, 2012 ). كذلك يحتوى نقي العظم على نوع ثان من الخلايا الجذعية التي تسمى بالخلايا الجذعية السدىية Stromal ، او الخلايا الجذعية اللحمية Mesenchymal stem cells MSCs التي توفر الدعم للخلايا الجذعية المكونة للدم ( Bianco and Robey, 2000 ).

## 2. 1.7. 2 الخلايا الجذعية المكونة للدم (HSCs) Hematopoietic stem cells

ان الوظيفة الرئيسية للخلايا الجذعية المكونة للدم هي أنها تتمايز إلى سلفيات خلايا الدم البيض والحمراء ، إذ تتمايز هذه الخلايا الجذعية المكونة للدم إلى اسلاف الخلايا اللمفية Lymphoid progenitor cells التي تنمو بعدها إلى الخلايا اللمفية بنوعها التائية T والبائية B ، وايضاً تتمايز الخلايا الجذعية المكونة للدم إلى اسلاف الخلايا النقيانية Myeloid progenitor cells التي تنمو إلى كل من كريات الدم الحمراء وكريات الدم البيض ( Bryder *et al.*, 2006 ; Sell , 2004 ).

إن أول معرفة للباحثين بالخلايا الجذعية المكونة للدم سنة (1945) ، إذ تم دراسة نقي العظام لمجموعة من الأشخاص الذين تعرضوا لجرعات مميتة من الإشعاع (Litzow , 2001) وفي سنة (1961) أجرى كل من الباحثين Till و McCulloch ، دراسة حول نقي عظام لفئران عرضت لمواد مشعة ، إذ قاما بنقل نقي عظام فئران سليمة وكانت النتيجة جيدة إذ انقذا حياة الفئران المصابة واثبتت هذه الدراسة بأن الخلايا الجذعية في نقي العظم تتكاثر وتعيد تكوين خلايا الدم بجميع أنواعها (Kaufman, 2009) ولاحظ الباحثون قدرة هذه الخلايا الجذعية المكونة للدم على التجوال داخل المجرى الدموي واللمفي (Massberg *et al.*, 2007). فضلاً عن الهجرة إلى الاعضاء المكونة للدم وغير المكونة للدم خلال حالات

التوازن Homeostasis وكذلك في حالات الإلتهاب والإجهاد ( Si *et al.*, 2010 ; Wright )  
 ( *et al.*, 2001 ) . ولاحظ الباحثون بعد حدوث الإلتهاب والخمج النسيجي ازدياد اعداد خلايا  
 العدلات في نقي العظم والدم ، فضلاً عن زيادة في تحرير الانزيمات البروتينية Proteases  
 من هذه الخلايا مثل Matrix metalloproteinase -1 وكذلك Neutrophil elastase  
 و Cathepsin - G ، هذه البروتينات تعمل عمل الوسيطات الكيماوية إذ تقوم بتحفيز هجرة  
 الخلايا الجذعية المكونة للدم إلى المجرى الدموي وإلى منطقة الإلتهاب ( Granick *et al.*,  
 ( 2012 ; Lvesque *et al.*, 2001 ) .

وتتماز الخلايا الجذعية المكونة للدم بخصائص مهمة ( Domen *et al.*, 2001 ) :

1. قابليتها على التجدد الذاتي Self-renewal ، إذ تستطيع أن تجدد نفسها ذاتياً وهو  
 عبارة عن انقسام الخلية المتماثل الذي يؤدي إلى تكوين خلايا جديدة تحتفظ بنفس  
 الإمكانية التطورية للخلية الجذعية الأصلية ولمدة زمنية غير محددة ، مما يساعدها على  
 الإنتاج المستمر لخلايا الدم الحمر ذات العمر القصير .
2. لها القدرة على الخروج والهجرة Migration من نقي العظم إلى الدورة الدموية وبالعكس  
 فضلاً عن امتلاكها خاصية تعرف بالرغبة في العودة Homing ، إذ تقوم الخلايا  
 الجذعية المنشئة للدم بالبقاء في أماكن وأعضاء معينة والاستقرار فيها وهي الأماكن  
 التي جاءت منها كنقي العظام ، ثم يليها بعض الأعضاء الأخرى مثل الكبد والطحال .
3. يتميز برنامجها الوراثي بخاصية الموت المبرمج Program cell death ، وهو عبارة  
 عن آلية تسبب موت الخلية الذاتي بدون أن تسبب أي علامة للإلتهاب . يعد موت  
 الخلايا المبرمج في الخلايا الجذعية المكونة للدم ضرورياً جداً للتنظيم والسيطرة على  
 أعداد وتكاثر هذه الخلايا .
4. تمتاز أيضاً الخلايا الجذعية المكونة للدم مثل باقي الخلايا الجذعية البالغة بالتحول  
 والتمايز إلى أنواع أخرى من الخلايا والأنسجة التي تختلف اختلافاً كاملاً عن النسيج  
 الذي نشأت منه ، وعن طريق خاصية اللدونة أو المرونة .

وتشير الدراسات إلى أنه بعد اجراء عملية نقل نخاع العظم ، استطاعت الخلايا الجذعية المكونة للدم من الهجرة إلى اعضاء الجسم المختلفة مع قدرتها على التمايز إلى خلايا بطانية ( Ferrari *et al.*, 1998 ) ، خلايا عضلية ( Rifai, 2000 ; Lin *et al.*, 2000 ) ، خلايا كبدية ( Theise *et al.*, 2000 ) ، خلايا بنكرياسية نوع بيتا ( Ianus *et al.*, 2003 ) ، خلايا قلبية ( Jackson *et al.*, 2001 ) ، خلايا عصبية ( Priller *et al.*, 2001 ) وإلى الخلايا المبطنة للكبيبات الكلوية ( Masuya *et al.*, 2003 ) .

وفي الوقت الحاضر يستخدم العلماء الخلايا الجذعية المكونة للدم في علاج الكثير من الأمراض وذلك لقدرتها على اعطاء انواع مختلفة من الخلايا والأنسجة مثل خلايا القلب والكبد وخلايا الدم ، إذ تحل الخلايا الجذعية محل الخلايا المصابة او التي توقفت وظائفها وذلك بطريقة الإستزراع الموضعي او بطريقة الحقن ( Abe *et al.*, 2010 ; Mehrotra *et al.*, 2010 ; Vassilopoulos *et al.*, 2003 )

## 2.7.2 الخلايا الجذعية اللحمية Mesenchymal Stem cells (MSCs)

هي خلايا جذعية بالغة لها القابلية على التمايز إلى أنواع عديدة من الخلايا وأهمها الخلايا بانية العظام والخلايا العضلية والخلايا الغضروفية والخلايا الشحمية والخلايا العصبية ويتم الحصول على هذه الخلية من نخاع العظم . وهي خلايا متعددة القدرة لعاء القابلية على التجدد الذاتي ، وتعد اسلافا للنسج غير المكونة للدم ( Augello *et al.*, 2010 ) . تم وصف هذه الخلايا لأول مرة سنة (1970) من قبل العالم Friedenstein وجماعته على أنها خلايا مغزلية الشكل شبيهة بالارومة الليفية Fibroblast-like cell ، ولها القابلية على الالتصاق ببلاستك الدوارق المعدة للزرع النسيجي كما أم لها القدرة على التمايز خارج الجسم الحي إلى

أنواع مختلفة من الخلايا الجسمية البالغة ، ويعد Kaplan اول من اطلق اسم الخلايا الجذعية اللحمية (MSCs) على هذه الخلايا (Caplan , 1991).

تمتاز الخلايا الجذعية اللحمية بكونها خلايا متعددة القدرات لها القابلية على التجدد الذاتي وعلى الانقسام خارج الجسم الحي ، كما ويمكن تحفيز نموها خارج الجسم إلى خلايا غضروفية Chondrocytes ، خلايا عظمية Osteocytes ، خلايا دهنية Adipocytes وارومات ليفية وخلايا عضلية هيكلية وخلايا عصبية وذلك بالاعتماد على ظروف نمو ملائمة لهذا الغرض (Pittenger *et al.*, 1999 ; Kopen *et al.*, 1999) .

ونتيجة للدراسات المستمرة لهذه الخلايا واهميتها ، فقد وضع المجتمع العالمي للعلاج الخلوي مميزات خاصة للخلايا الجذعية (Dominici *et al.*, 2006) بوصفها خلايا جذعية لحمية اذا كانت الخلايا تمتاز بأنها :

- لها القابلية على الالتصاق ببيلاستك دوارق الزرع النسيجي.
- تمتلك نمط مظهري يشبه الارومات الليفية Fibroblast cells.
- تمتلك مستقبلات لبعض المستضدات الخاصة .
- تكون متعددة القدرات Multipotent

عزلت هذه الخلايا الجذعية من اعضاء وانسجة مختلفة مثل العضلات الهيكلية (Williams *et al.*, 1999) ، النسيج الدهني (Zuk *et al.*, 2001) ، الحبل السري (Erices *et al.*, 2000) ، الرئة الكبد ونقي العظم (Campagnoli *et al.*, 2001).

## 2. 8 منشأ الخلايا الجذعية اللحمية Origin of Mesenchymal stem cells

على الرغم من البحوث العديدة التي أجريت على الخلايا الجذعية اللحمية لدراسة قدرتها على التمايز وكذلك دراسة خواصها العلاجية لعديدة ، إلا أن الدراسات حول منشأ وتطور هذه الخلايا قليلة جداً خلال مرحلة تطور الجنين (Zhao , 2013) ، تنشأ الخلايا الجذعية اللحمية من مصدرين رئيسيين أساسيين إالول هو من القمة العصبية Neural crest والثاني هو من طبقة إالديم المتوسط (Morikawa *et al.*, 2009) . حيث ان الخلايا الجذعية اللحمية البالغة Adult MSCs تنشأ من طبقة إالديم المتوسط ، في حين أن الخلايا الجذعية اللحمية الجنينية Embryonic MSCs تنشأ بشكل اساسي من القمة العصبية . وتعد هذه القمة العصبية عبارة عن نسيج جنيني مؤقت يتكون بشكل اساسي من الطيات العصبية Neural folds خلال مراحل التطور الجنيني للفقرات . اوضح الباحث Morikawa وجماعته أن هذه الخلايا الجذعية اللحمية تنشأ وبشكل اساسي من هذه القمة العصبية (Morikawa *et al.*, 2009) ، في حين اوضح الباحث Takashima وجماعته أن أول نشوء للخلايا الجذعية اللحمية وخلال فترة التطور الجنيني من طبقة تسمى بالطبقة الطلائية العصبية Sox1 neuroepithelium (Takashima *et al.*, 2007).

تعد طبقة إالديم المتوسط المصدر الرئيسي الآخر للخلايا الجذعية اللحمية التي سوف تكون مصدراً لنشوء الانسجة العظمية والانسجة الرابطة (Dennis and Charbord , 2002) إذ اوضح الباحث Slukvin (2011) أن نشوء هذه الخلايا الجذعية اللحمية من طبقة إالديم المتوسط ومن سليفات الخلايا الظهارية والخلايا اللحمية التي تسمى بـ Mesenchymo – ongioblast (Slukvin and Vodyanik, 2011) وهذه النتائج تثبت اهمية الخلايا الظهارية كمصدر مهم لهذه الخلايا الجذعية في مرحلة ما بعد الولادة . كما أن العديد من الدراسات أوضحت قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على التمايز إلى خلايا ظهارية ، إذ بينت هذه الدراسات وجود دورة في حياة الخلايا بالتحول من خلايا ظهارية إلى خلايا جذعية ومن ثم الرجوع إلى خلايا ظهارية مرة اخرى (Slukvin and Vodyanik , 2011 ; Medici *et al.*, 2010)

إن الخلايا الجذعية اللحمية التي نشأت من الطبقة الطلائية العصبية يقل عددها بشكل سريع في نقي العظم ، ولهذا يعتقد العلماء أنه وفي خلال الحياة ما بعد الولادة فإن الأهمية للخلايا الجذعية المشتقة من طبقة الإديم المتوسط يزداد خلال فترة النمو الجنيني ( Takashima *et al.*, 2007 ).

## Stem cells therapy

## 9. 2 العلاج بالخلايا الجذعية

تقدم الخلايا الجذعية أملاً غير مسبوق في علاج العديد من الأمراض في الإنسان والحيوان ، إذ تمتلك هذه الخلايا العديد من الخواص والمميزات مقارنة مع باقي خلايا الجسم التي مكنتها للاستخدام في العلاج الخلوي ، منها قابليتها الفريدة على التجدد الذاتي من خلال الانقسامات المتكررة وحتى بعد مدة طويلة من الخمول ، كما أنها خلايا غير متميزة ولكن وتحت ظروف فسيولوجية يمكنها أن تتمايز والتخصص إلى خلايا مختلفة ( Gade *et al.*, 2012 ).

تستخدم الخلايا الجذعية في علاج العديد من الحالات المرضية التي تصيب أعضاء وأنسجة الجسم المختلفة مثل أمراض القلب والدماغ والبنكرياس فضلاً عن استخدامها في علاج العديد من الأمراض المناعية والسرطان ( Larijani *et al.*, 2012 ; Gurudutta *et al.*, 2012 ).

تم استخدام الخلايا الجذعية في علاج امراض القلب المختلفة ، إذ لاحظ العديد من الباحثين قدرة هذه الخلايا على التمايز إلى الخلايا العضلية القلبية Cardiomyocytes وكذلك الخلايا العضلية الملساء المبطنة للأوعية الدموية والخلايا البطانية ( Gnacchi *et al.*, 2005 ; Gnacchi *et al.*, 2012 ) ، وهناك العديد من البحوث والدراسات التي اثبتت امكانية اصلاح وتجديد عضلة القلب عن طريق استخدام الخلايا المشتقة من نقي العظام في كل من الإنسان والحيوان ، إذ أدى استخدام هذه الخلايا الجذعية إلى تحسن

في وظائف القلب في الأشخاص المصابين باحتشاء عضلة القلب الحاد Acute infarction وكذلك لوحظ تكوين للأوعية الدموية الجديدة في الحيوانات المصابة بالذوى المزمن Chronic Ischemia (Williams and Hare, 2011 ; Quevedo *et al.*, 2009 ) .

كما واستخدمت الخلايا الجذعية في علاج أمراض الكبد المختلفة وبخاصة حالات تشمع الكبد liver chrrhosis (Lyra *et al.*, 2007 ; Mohamadnejad *et al.*, 2007 ) . إذ استطاع الباحث Terai وجماعته (2006) من حقن الخلايا الجذعية داخل الوريد البابي والشريان الكبدي في مرضى مصابين بتشمع الكبد ، ولاحظوا تحسناً كبيراً في وظائف الكبد مع انخفاض في مستويات البيليروبين Bilirubin وكذلك تحسن في مستويات الألبومين والبروتينات المفرزة من الكبد وبدون أي تأثيرات جانبية .

أيضاً استخدمت الخلايا الجذعية في علاج العديد من سرطانات الدم مثل سرطانات الدم نوع Lymphoplasic leukemia و Myeloid leukemia و الثلاسيما (Lucarelli *et al.*, 2012 ; Sagar *et al.*, 2007) . كما استخدمت الخلايا الجذعية في علاج السكتة الدماغية واصابات الحبل الشوكي (Larijani *et al.*, 2012 ; Nandoe ) ( Tewarie *et al.*, 2009 ) .

تم استخدام الخلايا الجذعية في علاج امراض الزهايمر ( Xuan *et al.*, 2009 ) ، ولاحظ الباحث Lee وجماعته (2010) حدوث زيادة في فعالية الخلايا الدبقية Glial cells مع انخفاض في حالات الإجهاد التأكسدي والموت المبرمج في مخ الفئران المصابة بالزهايمر مع تحسن في قدرات التعلم والذاكرة للفئران المحقونة بالخلايا الجذعية اللحمية وتم استخدام الخلايا الجذعية في علاج مرض باركنسون Parkinson's disease (Fischbach *et al.*, 2001) ، و سجل الباحث Venkataramana وجماعته (2010) تحسناً كبيراً في العلامات السريرية للمرضى المصابين بمرض باركنسون بعد حقنهم بالخلايا الجذعية اللحمية.

أيضاً استخدمت الخلايا الجذعية في علاج حالات الإنتان وذلك لامتلاك هذه الخلايا وبخاصة الخلايا الجذعية اللحمية خصائص عديدة منها قابليتها على تحويل الاستجابة الالتهابية وكذلك قدرتها على الحد من حالات الموت المبرمج للخلايا الذي يحدث في حالة الإنتان ( Weil *et al.*, 2009 ).

## 10. 2 الاستخدامات العلاجية للخلايا الجذعية في الطب البيطري Therapeutic uses of stem cells in veterinary medicine

يعدّ العلاج بالخلايا الجذعية من أهم العلاجات المعتمدة على الخلية التي تسمى بالعلاج الخلوي Cell therapy التي استخدمت حديثاً في التجارب والبحوث ما قبل السريرية والسريرية للعديد من الأمراض في الطب البيطري (Gattegno–Ho *et al.*, 2012) . إذ إن العلاج بهذه الخلايا يشمل على طرق عدة منها التوصيل الموضعي Local delivery أو عن طريق الحقن الجهازي Systemic injection ، وأن الخلايا الجذعية المستخدمة في العلاج قد تكون مأخوذة ومعزولة من نفس الحيوان Autologous أو تكون معزولة من نفس نوع الحيوان Allogeneic وقد تكون معزولة من أنواع مختلفة من الحيوانات Xenogeneic ( Gade *et al.*, 2012 ) .

أشارت العديد من الدراسات الحديثة إلى استخدام الخلايا الجذعية وبخاصة الخلايا الجذعية اللحمية MSCs الواسع في علاج الكثير من الحالات المرضية في الطب البيطري مثل حالات اذى الحبل الشوكي وكذلك اعتلالات العظام والغضاريف ، فضلاً عن استخدامها في اصلاح الإلذى الذي يصيب الجهاز القلبي الوعائي ( Gattegno–Ho *et al.*, 2012 ; Gade *et al.*, 2012 ) .

تم عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي العظام ومن النسيج الدهني Adipose tissue ( Ryu *et al.*, 2009 ; Jung *et al.*, 2009 ; Nixon *et al.*, 2008 ) واستخدمت في علاج الحالات المرضية السريرية في كل من الكلاب والخيول والماعز ، وحالياً هنالك العديد من الشركات الخاصة التي تقوم بتجهيز وتوفير الخلايا الجذعية لعلاج الإصابات الغضروفية و العظمية في القطط والكلاب والخيول مثل شركة Vetstem (<http://www.vet-stem.com>) و Medistem الأمريكية وكذلك شركة Histostem الكورية (Gade *et al.*, 2012) .

تمتلك الخلايا الجذعية اللحمية القدرة على التمايز إلى خلايا عظمية وغضروفية ، هذه الميزة مكنتها من الاستخدام في علاج العديد من الاعتلالات للأنسجة الغضروفية والعظمية التي من الصعب التئامها في الحيوانات المختلفة مثل الكلاب والخيول الإغنام ( Fortier *et al.*, 2010 ; Arinze *et al.*, 2003 ) . إذ استخدمت الخلايا الجذعية اللحمية المحقونة داخل المفاصل المصابة في الماعز مما أدى إلى تحفيز تجديد واصلاح الأنسجة الغضروفية لمفصل الركبة (Murphy *et al.*, 2003) ، وكذلك استخدمت في علاج التهاب المفاصل المزمن في الكلاب (Black *et al.*, 2007) . كما استخدمت الخلايا الجذعية اللحمية في اصلاح الإلذى العظمي الغضروفي المزمن في الحيوانات الكبيرة مثل الخيول (Fortier *et al.*, 2010) . كما وتم استخدام الخلايا الجذعية اللحمية في علاج تجدد العظام نظراً لقدرة الخلايا الجذعية على تحفيز تكوين نسيج عظمي جديد في المنطقة المغروسة بالخلايا . إذ تم استخدامها لعلاج الكسور في الكلاب (Lee *et al.*, 2009) . ايضاً استخدمت الخلايا الجذعية اللحمية لعلاج كسور عظام الفخذ (Kon *et al.*, 2000) واصلاح كسور عظم الساق في الماعز (Liu *et al.*, 2010)

كما استخدمت الخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظام في اصلاح اعتلالات الإوتار والإربطة الموجودة في الركبة ، إذ استخدمت الخلايا الجذعية في علاج وتجديد مادة الإوتار Tendon matrix للوتر superficial flexor tendon في الخيول ( Smith *et al.*, )

(2003) . كذلك استخدمت الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من النسيج الدهني في علاج التهاب الأوتار المحدث تجريبياً في الخيول (Carvalho *et al.*, 2011) .

فضلاً عن ما تقدم ، فقد تم استخدام الخلايا الجذعية في تحفيز التئام الجروح ، ففي دراسة قام بها الباحث Wu وجماعته ( 2007 ) على الجرذان المصابة بالسكري المحدث تجريبياً مع عمل جروح جلدية فيها ، لاحظ أن حقن الخلايا الجذعية قد ساهم في تحسن وشفاء هذه الجروح الجلدية وخلال مدة زمنية قصيرة . ايضاً لاحظ الباحث Krause وجماعته (2001) ان الخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظام تستطيع التمايز إلى خلايا كيراتينية في طبقة البشرة Epidermal keratinocytes وإلى خلايا طلائية جريبية Follicular epithelial cells وخلايا الغدد الزهمية Sebaceous gland cells وكذلك إلى خلايا تشجيرية Dendritic cells بعد عملية حقن هذه الخلايا الجذعية اللحمية حول الجروح المحدثه تجريبياً في الفئران ، وفي الماعز لوحظ ان حقن الخلايا الجذعية اللحمية والمعزولة من الحبل السري سبب تحسناً كبيراً في جروح الجلد ، إذ لوحظ اعادة وتجدد للخلايا الطلائية Re-epithelization ، مع حدوث التهاب بسيط وكذلك كميات قليلة من النسيج الحبيبي Granulation tissue وندب بسيطة (Azari *et al.*, 2011) .

كما وتم استخدام الخلايا الجذعية في حالات كثيرة محدثة تجريبياً في الحيوانات المختبرية كاحتشاء الدماغ Cerebral infarction (Jeong *et al.*, 2005) ، ونقص التروية في الدماغ Cerebral ischemia (Chen *et al.*, 2001) ، واحتشاء عضلة القلب Myocardial infarction (Orlic *et al.*, 2001) واضطرابات المناعة الذاتية (Cristofanilli *et al.*, 2011) ، وعلاج داء السكري المحدث تجريبياً في الفئران (السبعاوي ، 2013).

## 11.2 الإنتان sepsis

إن كلمة الإنتان Sepsis ، تم اشتقاقها من الكلمة الإغريقية "σηψις" التي تعني التفسخ او التعفن ، ويُعرف الإنتان على أنه متلازمة سريرية خطيرة تنتج من تفاعل معقد ما بين المضيف والمخمجات المرضية ، ويتميز باستجابة التهابية جهازية غير منتظمة وبصورة غير مسيطر عليها وتحدث نتيجة عدوى جرثومية وظهور الجراثيم وذيواناتها في الدم والإنسجة (Lima *et al.*, 2011) ، ترتبط حالة الإنتان مع حالات الخمج الشديدة والاستجابة الالتهابية الجهازية لهذا الخمج ، وعادة تتسبب به الجراثيم السالبة الكرام على الرغم من أنه يمكن أن تتسبب به عصيات الجراثيم الموجبة الكرام والفطريات ويطلق عليها بمتلازمة الاستجابة الالتهابية الجهازية (SIRS) Systemic inflammatory response syndrome (Schulte *et al.*, 2013 ; Geroulanos and Douka , 2006)

يتميز الإنتان الشديد Severe sepsis بكونه حالة متقدمة من الإنتان التي يرافقها خلل وظيفي في اعضاء الجسم المختلفة (MOF) Multiple Organ Failure (Abraham ) (Singer, 2007 and ) ويمكن تعريف الخلل الوظيفي للأعضاء على أنه أذى الرئة الحاد Acute lung injury ، شذوذ وخلل في عمليات التخثر الدموي ونقص شديد في الصفيحات الدموية وفشل في كل من الكبد والقلب والكلية ، وهذه يسبب ما يعرف الصدمة الإنتانية Septic shock التي ترتبط مع معدلات نفوق عالية (Griffiths and Anderson , 2009) .

### 1.11.2 مرضية الإنتان Sepsis Pathogenesis

سلسلة من التفاعلات النسجية والوعائية تحدث داخل الجسم عند تعرضه إلى الإذى او الخمج الجرثومي ، إذ يحدث استجابة سريعة للأوعية الدموية تتمثل بحدوث تقلص بالأوعية الدموية الشعرية ولفترة قصيرة يعقبها حدوث توسع في هذه الأوعية الدموية مما يزيد من التجهيز الدموي في منطقة الخمج مع زيادة في نفوذية بطانة الأوعية الدموية مما يسهل مغادرة مكونات الدم إلى موضع الإصابة إذ يحدث استجابة للخلايا الالتهابية التي تهاجر إلى منطقة الخمج (McGavin and Zackary , 2010).

تلعب الاستجابة المناعية الفطرية Innate immune response التي تكون قادرة على الاستجابة الإنسية ضد مسببات المرضية دوراً رئيساً في مرضية حالة الانتان (Schulte *et al.*, 2013). إذ يتم التعرف على مسببات المرضية داخل الجسم عن طريق مستقبلات تميز الممرض Pathogen recognition receptors ، التي تتواجد على الحواجز الطلائية ، فضلاً عن الخلايا المناعية من البلعمات Macrophages والخلايا النشجيرية Dendritic cells (Akira *et al.*, 2006) ، ويوجد نوع خاص من هذه المستقبلات يطلق عليه Toll –Like receptors ، التي تستطيع تمييز جزيئات موجودة في مسببات المرضية التي يطلق عليها Pathogen associated molecular pattern (van der Poll and Opal , 2008 ; Cinel and Dellinger , 2007) ومثال على هذه الجزيئات متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide الذي يعدُّ عامل الفوعة للجراثيم السالبة الكرام ، وكذلك الببتيدوكلايكان peptidiglycan وحامض اللابيويتيكويك Lipoteichoic acid وهما من مكونات جدار الجراثيم موجبة الكرام ، فضلاً عن بروتين الفلاجلين Flageline و DNA الفيروسات (LaRosa and Opal , 2012) .

إن الآلية التي يحدث بها الانتان تكون مرتبطة بالوسائط الالتهابية Chemical mediators ، إذ إنه وعلى الرغم من أن نظام المناعة في الجسم والاستجابة الالتهابية تكون ضرورية للتغلب على الخمج ، فإن التحرير غير المنتظم وبكميات كبيرة من الوسائط الالتهابية والانترلوكينات وغيرها تسبب البدء في حالة الانتان القاتلة (Burkovskiy *et al.*, 2011 ; Russel *et al.*, 2013) .

يتميز الانتان باستجابة التهابية جهازية شديدة عند حدوث الخمج بعوامل ومسببات مرضية مختلفة ، والعامل المحفز لهذه الاستجابة هو التفاعل الذي يحدث ما بين الذيفانات التي تتحرر من جدار الجراثيم مثل الذيفان الداخلي Endotoxin مع خلايا المضيف المناعية (Cinel and Dellinge , 2007) . هذا التفاعل يسبب تنشيط للخلايا المناعية للمضيف ومن ثمَّ تسبب تحرير مجموعة كبيرة من الوسيطات والساييتوكينات الالتهابية مثل عامل نخر الورم الفا TNF- والانترلوكينات وخاصة IL-1 و IL-6 ، هذه الوسيطات والساييتوكينات

الالتهابية تسبب تفعيل منتشر للاستجابة الالتهابية الجهازية ، ومن ثمّ تتحرر كميات كبيرة من الوسائط الموسعة للأوعية الدموية مثل البروستاغلانينات Prostaglandines والثرومبوكسان Thromboxane A2 ووكسيد النترريك NO (Dejager *et al.*, 2011) . هذه الوسائط الالتهابية التي تفرز بوجود الالتهابات الجرثومية تسبب تحفيز التصاق الخلايا البيض على سطح الخلايا البطانية ، فضلاً عن تحفيز تحرير الإنزيمات الحالة القاتلة للخلايا مسببة اذى لبطانة الأوعية الدموية مما يؤدي إلى نقص في جريان الدم ونضوحه خارج الأوعية الدموية مسبباً نخر وخلل في الأنسجة والأعضاء الحيوية المختلفة ( Treacher and Brown , 2009 ; Aird , 2003 )

يتميز الانتان بحدوث طورين من الاستجابة الالتهابية داخل الجسم ، الطور الأولي الذي يعرف بالطور الالتهابي الشديد Hyper-inflammatory phase الذي يتميز بحدوث تضخم في الاستجابة الالتهابية والمناعية الذي يتسبب عنه تحرير كميات كبيرة من الوسيطات والسايوتوكينات الالتهابية التي اطلق عليها الباحثين عاصفة السايوتوكينات Cytokines storm (Burkovskiy *et al.*, 2013 ; Dejager *et al.*, 2011) . هذه السايوتوكينات البادئة للالتهاب Pro-inflammatory cytokines مثل ( TNF- $\gamma$  و IL-1 و IL-6 ) والكيموكينات Chemokines مثل البروتين الجاذب لوحيدات النواة monocyte chemoattractant protein MCP-1 تزداد مستوياتها بشكل كبير في بداية الانتان ( Matsukawa *et al.*, 1999) ، وبالتزامن مع هذه الاستجابة الالتهابية المتضخمة الأولية ، فإن الجسم يقوم ايضاً بتحرير وسيطات مانعة للالتهاب تسمى بـ Anti-inflammatory mediators وبخاصة الإنترلوكين IL-10 وعامل النمو TGF- $\beta$  واللذان يسببان تقليل ونثييط للاستجابة الالتهابية بعد التخلص من مسببات المرضية (Schulte *et al.*, 2013) ونتيجة لهذه الوسيطات الالتهابية فان معظم المصابين بالانتان يستمرون بالحياة خلال الفترة الأولية للاستجابة الالتهابية الشديدة ولكن يتحولون إلى الطور الثاني من الانتان الذي يطلق عليه بالطور الالتهابي الضعيف Hypo-inflammatory phase أو طور النثييط المناعي Immune suppression phase (Muenzer *et al.*, 2010 ; Dejager *et al.*, 2011) .

توجد عوامل عديدة تساهم في حالة التثبيط المناعي الذي يحدث في المرحلة الثانية من الإلتان ، منها تثبيط تحفيز العدلات ، وكذلك الموت المبرمج Apoptosis السريع للخلايا اللمفية وكذلك الخلايا التشرجية ( Hotchkiss and Nicholson , 2008 ; Ward , 2006 ) ، وخلال هذا الطور يكون الجسم حساس جداً للخمج Nasocomial ولهذا وجد الباحثون أن عملية تثبيط الموت المبرمج للخلايا المناعية الذي يتسبب عنه الإلتان تعتبر واحدة من طرق علاج حالة الإلتان ( Wesche-Soldat , 2013 ; Richard *et al.*, 2007 ) ، إذ لاحظ الباحث Coopersmith وجماعته (2002) من أن الفئران التي تم تثبيط حالة الموت المبرمج للخلايا فيها أحدث تحسناً في مستويات البقاء على قيد الحياة واستخدم كل من Hotchkiss و Nicholson (2006) مواد كيميائية مثبطة للـ Caspases المنتشط ، التي ساهمت أيضاً في حماية الفئران المصابة بالإلتان تجريبياً ، أيضاً بين (Pene *et al.*, 2009) إن عملية تثبيط المستقبلات Toll-like وخاصة مستقبلات TLR2 و TLR4 سبب انخفاض ملحوظ في حالة الموت المبرمج للخلايا التشرجية في الطحال عند الحيوانات التي تعاني من الإلتان . كذلك يتم استخدام IL-15 ، الذي أظهر تأثيرات ايجابية في تقليل حالات الموت المبرمج للخلايا المناعية وكذلك زيادة في مستويات الإنترفيرون كما (Inoue *et al.*, 2010) ، إذ يعد الموت المبرمج للخلايا Apoptosis عملية ضرورية للتخلص من الخلايا وبصورة مسيطر عليها وذلك لتقليل الضرر على الأنسجة ويحدث الموت المبرمج للخلايا عن طريق ثلاث آليات رئيسة ، آلية موت الخلايا طريق مستقبلات الموت الخارجية Extrinsic death Receptors وآلية موت الخلايا المبرمج الداخلي والمعتمد على بيوت الطاقة والآلية الثالثة هي الموت المبرمج للخلايا المحفز بواسطة الإجهاد Stress-induce apoptosis والمعتمد على الشبكة البلازمية الداخلية (Wesche - Soldato *et al.*, 2005).

يحدث موت الخلايا اللمفية المبرمج بشكل غير منتظم في حالة الإلتان ( Hotchkiss *et al.*, 1999) . إذ تلعب الخلايا اللمفية B و T دوراً رئيساً في الاستجابة المناعية في حالة الإلتان إذ تتحفز هذه الخلايا نتيجة للسايتوكينات المتحررة وكذلك بسبب وجود العديد من

المستضدات ويحدث موت الخلايا المبرمج للخلايا اللمفية بصورة طبيعية وذلك للتقليل من اعداد هذه الخلايا المحفزة للسيطرة على الاستجابة المناعية المحفزة بعد القضاء على العوامل الممرضة اما في حالة الانتان فإن موت الخلايا اللمفية يكون غير منظم وبخاصة في التوتة Thymus والطحال وكذلك في الانسجة اللمفية الموجودة في الامعاء GALT مما يؤدي الى حالة من التثبيط المناعي الذي بدوره يؤدي الى عدم قدرة الجسم على محاربة الانتان ( Chung *et al.*, 2001 ; Mahidhara and Billiar, 2000 ).

اوضحت العديد من الدراسات التي استخدمت احداث الانتان المتعدد الجرثومي التجريبي أن موت الخلايا اللمفية يحدث بعد 12 ساعة من عملية CLP في الطحال ، في حين اوضحت هذه الدراسات أن موت الخلايا اللمفية في التوتة حدث بعد مرور اربع ساعات فقط من عملية CLP ، كما ووضحت هذه الدراسات بأن للخلايا اللمفية في التوتة دوراً في الاستجابة الالتهابية السريعة الذي يتم عن طريق الموت المبرمج الذي يحدث بسبب افراز الوسيطات البائدة للالتهاب التي تتحرر خلال الساعات الاولى في الانتان ( Wesche –Soldato *et al.*, 2005 ; Hiramatsu *et al.*, 1997 ) .

اوضح Hotchiknss ( 2003 ) حدوث زيادة في موت الخلايا اللمفية وبصورة غير منتظمة في الفئران المحدث بها الانتان تجريبياً الذي يترافق معه زيادة في معدلات النفوق ، إذ بين أن موت الخلايا اللمفية الذي يتسبب عنه الخلل المناعي بسبب انخفاض القدرة على تحرير الإنترفيرون - Interferon الذي يعد محفز قوي للخلايا البلعمية ومنتشط للأستجابة المناعية المعتمدة على الخلايا Cell – mediated immunity (Docke *et al.*, 1997) . كما ووضح الباحث Ayala وجماعته ( 1999 ) عدم قدرة الجسم على التخلص من الخلايا اللمفية الميتة بسبب الموت المبرمج وعدم قدرة الخلايا البلعمية على ابتلاعها التي تحدث في حالة الانتان والصدمة الانتانية مما يسبب نخر واذى للأنسجة المحيطة .

تؤثر حالة الانتان على مسارات العملية الالتهابية ، فضلاً عن تأثيراتها على مسارات عملية التجلط Coagulation pathways ، كما ويؤثر الانتان ايضاً على

جهاز المتمم Complements system (Dejager *et al.*, 2011) ، تحدث عملية الاستجابة الالتهابية بعد حدوث الإنتان ويترافق معها أيضاً تحفيز لمسارات بادئات التجلط Pro-coagulant pathways ، التي ينجم عنها تطور حالات التجلط داخل الاوعية الدموية الشعرية الذي يطلق عليه بالتجلط داخل الاوعية الدموية المنتشر Disseminated intravascular coagulation (DIC) (song *et al.*, 2013) .

ولاحظ الباحث van Veen (2006) ، ان مستويات المواد المضادة للتجلط الطبيعية داخل الجسم مثل البروتين المحفز Activated protein- C ومثبطات عامل النسيج Tissue factor inhibitors ، ينخفض بشكل كبير في معظم حالات الإنتان ، لذلك فان اعطاء وحقن البروتين المحفز C سبب اعادة للتوازن في عمليات التجلط وتحلل الليفين Fibrinolysis ومن ثم سبب زيادة في مستويات البقاء على قيد الحياة في الحيوانات التي احدث فيها الإنتان عن طريقة ربط الاعور وثقبه CLP (Gupta *et al.*, 2007) .

## 2.11.2 طرق احداث الإنتان تجريبياً Experimental sepsis methods

تم استخدام طرق عدة من قبل الباحثين لإحداث حالة الإنتان تجريبياً لدراسة التطورات الفسلجية المرضية للإنتان (Dejager *et al.*, 2011 ; Namas *et al.*, 2012 ) إذ تم احداث الإنتان في العديد من الحيوانات المختبرية مثل الجرذان والفئران كذلك تم احداث الإنتان في الحيوانات الكبيرة مثل الاغنام والماعز ( Noda *et al.*,1994 ) وفي الخنازير (Ji *et al.*, 2012) وايضاً في الكلاب (Zanotti-Cavazzoni ,2012 ; Song *et al.*,2012 ) ( and Goldfarb ,2009 ) والارانب ( Matute-Bello , *et al.*,2001) .

تم تطوير نماذج حيوانية عديدة لاحداث الإنتان ، وتتضمن هذه النماذج عادة ثلاث استراتيجيات ، الاستراتيجية الاولى تتضمن إعطاء وحقن سموم وذيوانات الجرثيم مثل الزايموسان Zymosan و متعدد السكريد الشحمي LPS ، أما الاستراتيجية الثانية فتتضمن حقن وإعطاء

المسببات المرضية الحية مثل الجراثيم والفايروسات ، وإلاستراتيجية الأخيرة فتتضمن إحداث تغيير واذى في الحواجز الوقائية الداخلية للحيوان مثل الأمعاء (Dejager *et al.*, 2011) .

استخدم نموذج الإنتان داخل البطن Intra-abdominal sepsis لأول مرة في الثلاثينات من القرن الماضي وبالتزامن مع عزل الذيفانات الداخلية الجرثومية والحقن في الوريد او داخل الخلب للجراثيم السالبة الكرام ، وهيمن هذا النموذج للإنتان على البحوث والدراسات لمدة ثلاثين عاماً (Deitch , 2005) . في بداية الستينات تم استخدام نماذج اخرى مثل حقن البراز مع اضافة مواد مساعدة التي تهدف لإحداث حالة التهاب الخلب ولكن هذه النماذج انخفض استخدامها بسبب زيادة وسرعة حدوث حالات النفوق ، وفي الثمانينات قام كل من من Wichterman و Baue و Chaudry باستخدام نموذج ربط الاعور وثقبه CLP لإحداث حالة الإنتان داخل البطن ، إذ قام هؤلاء الباحثين بنشر استعراض مفصل للنماذج القديمة مع تقديم نموذج جديد للإنتان الذي لايزال يعدُّ وعلى نطاق واسع المعيار الذهبي لنماذج الإنتان المتعدد الجراثيم في وقتنا الحالي ( Wichterman *et al.*, 2011 ; Dejager *et al.*, 1980) .

ان نموذج CLP لإحداث الإنتان له مميزات عديدة مقارنة مع نموذج السمومية المعوية Enterotoxic models ، إذ أنه يعبر وبشكل دقيق عن الوضعية السريرية للإنتانية التي يحصل فيها تلوث بمحتويات الأمعاء الداخلية في التجريف الخلبي بعد عملية التداخل الجراحي ( Remick *et al.*, 2000) مسبباً إحداث التهاب الخلب peritonitis الذي يعد واحداً من المضاعفات الخطيرة للعمليات الجراحية في كل من الإنسان والحيوانات إذ يسبب نسب وفيات عالية ( Dejager *et al.*, 2011) .

كما ويتميز نموذج CLP بإمكانية السيطرة على احداث حالات انتان شديدة وقاتلة أو حالات اقل شدة وغير قاتلة وذلك بالاعتماد على مكان ربط الاعور وكذلك عدد الثقوب المحدثه في جدار الاعور وايضاً على حجم الابرة التي يحدث بها هذه الثقوب ( Menezes *et al.*, 2008 ; Rittirsch *et al.*, 2008) . كما ويتميز الإنتان المحدث تجريبياً عن طريق CLP بحدوث طورين للمرض ، الطور الأولى الذي يطلق عليه Hyper-dynamic phase ويتميز بزيادة الضخ الدموي من القلب وزيادة النضوحية

## للأنسجة

( Toscano *et al.*, 2011 ; Van der Poll and Opal, 2008 ) والصفة المميزة لهذا الطور هي زيادة تحرير الوسيطات الالتهابية من قبل الخلايا المناعية التي تم تحفيزها عن طريق الخمج الجرثومي او الذيفانات . أما الطور الثاني الذي يحدث بعد 12 ساعة من احداث الإنتان فيطلق عليه Hypo-dynamic phase ، الذي يتميز بانخفاض جريان الدم في الأنسجة الإوعية الدموية ، انخفاض في وظيفة الضخ القلبي مع وجود اذى وخلل في وظائف الاعضاء والأنسجة المختلفة وخلال هذا الطور من الإنتان يحدث اضطراب للجهاز المناعي من خلال وجود خلل في الكشف عن المستضدات وانخفاض معقد التوافق النسيجي الرئيسي MHC II مع وجود فشل في عملية البلعمة وزيادة في حالات الموت المبرمج لخلايا الجهاز المناعي مسببة حالة التثبيط المناعي المترافقة مع الإنتان. (Burkovskiy *et al.*, 2013 ; Dejager *et al.*, 2011 ; Hotchkiss and (Nicholson, 2006).

## 12. 2 الخلايا الجذعية اللحمية والإنتان Sepsis and Mesenchymal Stem cells

إن الخلايا الجذعية تعزز التجدد في الأنسجة المصابة وتمنع تلف وخسارة الأنسجة المهتدة ، إذ تقوم بتحسين وظائف الأنسجة بعد التعرض للأذى مثل حالات نقص الدم Ischemia والخمج الجرثومي ( Nauta and Crisostomo *et al.*, 2008 ; Fibbe, 2007). ان عملية حقن الخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد أو داخل التجويف الخليبي تكون محفزة للمضيف بسبب القابلية الداخلية لهذه الخلايا على الهجرة بفعل عملية الجذب الكيميائي Chemotactic gradient إلى الأنسجة المصابة مثل الرئة ، القلب ، الكبد ، ، الكلى، والدماغ ( Ortiz *et al.*, 2007 ; Mahmood *et al.*, 2003).

أظهرت الدراسات الحديثة هجرة أعداد كبيرة من الخلايا الجذعية اللحمية بعد حقنها داخل الوريد وبجذب كبير إلى كل من الرئة والكبد بعد إحداث سمدمية الدم المحدثه تجريبياً بواسطة حقن متعدد السكريد الشحمي للجراثيم LPS-induced Endotoxemia (Weil *et al.*, 2009) ، كما لوحظ تركيز عالي من الخلايا الجذعية اللحمية في كل من الرئة

والكلية والطحال كاستجابة للإنتان المتعدد الجراثيم (Nemeth , *et al.*, 2009) . وأظهرت دراسات حديثة وجود العديد من جزيئات الالتصاق Adhesion Molecules والمتواجدة على سطح الخلايا الجذعية اللحمية (Ren *et al.*, 2010 ; Brooke *et al.*,2008) واهم هذه الجزيئات اللاصقة هو جزيئات التصاق الخلايا الوعائية Vascular cell adhesion molecules (VCAM) ، الذي تبين أنه ينظم هجرة وانسلاخ هذه الخلايا بعد تعرضها لعامل نخر الورم TNF- $\alpha$  (Segers *et al.*, 2006).

ان قابلية الخلايا الجذعية اللحمية على الهجرة والانسلاخ إلى مواقع مختلفة من الأنسجة المخمجة يجعل هذه الخلايا مميزة وخاصة في علاج الإلذى والإعتلال الوظيفي للأعضاء والأنسجة المختلفة التي تلاحظ في حالة الإلتان . وبعد الإلتان من الأمراض التي تتطور بسرعة لذلك فان عملية تفاعل الخلايا الجذعية اللحمية مع الخلايا والأنسجة المجاورة قد تعد مهمة في تحديد بقاء المضيف على قيد الحياة ( Wannemuehler *et al.*,2012 ; Kuroda *et al.*, ) (2011) .

إن الخلايا الجذعية اللحمية تقوم بعملية التجدد والإصلاح من خلال خمس آليات او تأثيرات رئيسة هي :

### Anti-inflammatory effects

### 2. 1.12. تأثيرات مضادة للالتهاب

تحمي الخلايا الجذعية اللحمية المضيف من خلال تنظيم الإستجابة المناعية للإنتان إذ إن استجابة الجهاز المناعي للخمج الجرثومي يتم من خلال تحفيز وتنشيط متتاليات الإستجابة الإلتهابية الأولية Initial pro-inflammatory cascades ، إذ تقوم الخلايا الجذعية اللحمية بتخفيف الإلذى الناجم من هذه المتتاليات الإلتهابية من خلال التوازن في خفض تحرير الساييتوكينات البادئة للاستجابة الإلتهابية والزيادة في إنتاج الساييتوكينات المضادة للالتهاب (Gonzalez-Rey *et al.*, 2009 ; Tanaka *et al.*, 2008) ، ومن أهم هذه الساييتوكينات المضادة للالتهاب هي TGF- $\beta$  و IL-10 و IL-13 . وتقوم الخلايا الجذعية

الحمية بتنظيم Down-Regulation للسايكوكينات البادئة للالتهاب مثل  $TNF-\alpha$  و IL-6 و IL-1 (Choi *et al.*, 2011 ; Crisostomo *et al.*, 2008) .

كما وتمتلك الخلايا الجذعية اللحمية اليات مباشرة مضادة للجراثيم antibacterial ، إذ بين الباحث (Krasnodembskaya *et al.*, 2010) ، دور الخلايا الجذعية اللحمية في خفض اعداد الجراثيم داخل الجسم الحي في الفئران من خلال افراز ببتيدات مضادة للجراثيم Antibacterial peptides تسمى LL-37 ، كاستجابة للخمج بواسطة جراثيم إلايشريشيا القولونية ، وبعد LL-37 من احد انواع Catheliciden وهي عبارة عن ببتيدات متعددة تتواجد داخل الجسيمات الحالة للخلايا البلعمية والخلايا البيض تلعب دوراً مهماً في الاستجابة المناعية المضادة للجراثيم في الثدييات ، ويمتلك LL-37 طيفاً واسعاً من الفعاليات الحيوية تتضمن القتل المباشر للجراثيم من خلال تحطيم جدار الخلايا ، ويلعب دوراً مهماً في عملية الجذب الكيميائي ، وتنظيم عملية الاستجابة الإلتهايبية وكذلك في عملية تكوين اوعية دموية جديدة ويمنع من حالات موت الخلايا المبرمج فضلاً عن تأثيراته في عملية التئام الجروح (Bucki *et al.*, 2010 ; Nijnik and Hancock , 2009) . وسجلت دراسات حديثة قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على خفض أعداد الجراثيم في الحيوانات المستخدمة كنموذج للانتان (Nemeth *et al.*, 2009 ; Mei *et al.*, 2007) ، كما وتم دراسة قدرة هذه الخلايا الجذعية على زيادة فعالية البلعمة من قبل الخلايا البلعمية ، إذ اوضح (Kim and Hematti , 2009) أن عملية حضان الخلايا البلعمية مع الخلايا الجذعية اللحمية سببت زيادة في نشاط خاصة البلعمة للتخلص من الجراثيم فضلاً عن تحسين واصلاح الأنسجة المخمجة ، وسجل Gonzalez-Rey وجماعته (2009) انخفاض في أعداد الجراثيم المتواجدة داخل الخلب ، الطحال والكبد للفئران المخمجة بالانتان عن طريق CLP والمعالجة بالخلايا الجذعية اللحمية بعد 24 ساعة ، كذلك وباستخدام نفس النموذج لإحداث إلتان ، وبعد 28 ساعة سجل ( Mei *et al.*, 2010 ) قدرة الخلايا الجذعية على تحفيز جين تحفيز البلعمة phagocytosis – promoting gene في الخلايا البلعمية ، الذي يسبب زيادة في التخلص من الجراثيم الموجودة في الطحال.

ان عملية حقن هذه الخلايا الجذعية للحيوانات المحدث إالانتان فيها تجريبياً لم تظهر تحسناً في وظائف الاعضاء فقط ، وانما حسنت من قابلية هذه الحيوانات على البقاء على قيد الحياة ، إذ وجد Nemeth وجماعته سنة 2009 تحسناً ملحوظاً في معدلات البقاء على قيد الحياة من 10% - 50% بعد إالانتان المحدث تجريبياً بواسطة CLP في الفئران التي حقنت بعد ساعة بالخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد ، كما وسجل الباحث Gonzalez-Rey ، زيادة في معدل البقاء على قيد الحياة من 20% - 80% بعد اليوم العاشر من اجراء إالانتان بطريقة CLP واعطاء الخلايا الجذعية اللحمية بالحقن داخل التجويف الخليبي بعد 4 ساعات من احداث إالانتان (Gonzales -Rey *et al.*, 2009) .

## 2.12. 2 تأثيرات مضادة لموت الخلايا المبرمج Anti-Apoptotic effects

تعدُّ خاصية موت الخلايا المبرمج مفيدة للكائن الحي وكاستجابة للخلايا للضرر او الخمج ، وهي العملية التي تموت بها الخلايا بشكل طبيعي إذ تحدث تغيرات كيميائية حيوية وشكلية ، وتحدث في جميع الانسجة اثناء النمو وفي بعض الانسجة البالغة بسبب دورها المهم في تنظيم تشكيل الانسجة ، وقد تصاب الخلايا باضرار بالغة ويصعب اصلاحها أو وصولها إلى الشيخوخة أو تعرضها لظروف فسلجية تؤدي إلى موت وانتحار الخلايا وهي مفيدة للكائن الحي (Hotchkiss and Nicholson , 2006) . لذا تعدُّ هذه الآلية مفيدة للكائن الحي على عكس ما يحدث في حالة إالانتان إذ يسبب موت وانتحار الخلايا وعلى نطاق واسع وخاصة الخلايا اللمفية حالة من التثبيط المناعي (Wesche-Soldato *et al.* , 2007) ، إذ إن موت الخلايا المبرمج يحدث عادة بسبب السايوتوكينات المفرزة وخاصة TNF- $\alpha$  الذي يسبب تفعيل وتنشيط نظام Caspase ، وهذه الحالة تسبب نقصاً شديداً في الخلايا اللمفية Lymphopenia التي تعدُّ أحد نواتج حالة إالانتان مسببة حدوث الطور الثاني من إالانتان الذي

هو التثبيط المناعي Immunosuppression الذي غالباً ما يكون مميتاً للكائن الحي (Richard *et al.*, 2013 ; Dejager *et al.*, 2011) .

تمتلك الخلايا الجذعية اللحمية القدرة على تقليل موت وانتحار الخلايا عن طريق عدة آليات منها تنظيم Down-Regulation مسارات موت المايتوكوندريا وكذلك تنظيم زيادة Up-Regulation في عملية علاج DNA ، فضلاً عن زيادة في فعاليات مضادات الأكسدة (Murphy *et al.*, 2013 ; Dernbach *et al.*, 2004) ، وسجل Yagi وجماعته سنة 2010 قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على تقليل نسبة موت الخلايا المبرمج في كل من الكلية والرئة للفئران المصابة بالخمج الجرثومي ، وفي دراسة مماثلة سجل Mei وجماعته (2010) قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على منع حدوث حالة موت الخلايا المبرمج في الكلية والرئة في الفئران التي احدث إلانتان فيها عن طريق ربط الإاعور وثقبه.

## 2. 3.12. تأثيرات تكوين أوعية دموية جديدة Neoangiogenic effects

اوضحت دراسات حديثة امتلاك الخلايا الجذعية اللحمية خصائص تكوين اوعية دموية جديدة ، إذ لوحظ امتلاك هذه الخلايا الجذعية على مستقبلات لسايتوكينات وعائية المنشأ (Gnecchi *et al.*, 2006 ; Kinnaird *et al.*, 2004 ) Angiogenic cytokines وتقوم الخلايا الجذعية اللحمية بإفراز عوامل نظيرة الصماوية Paracrine factors مثل عامل النمو البطاني الوعائي VEGF وعامل نمو الخلايا الليفية FGF وعامل النمو الخلايا الكبدية HGF و Angiopoietin (Ang)-1 التي تقوم بتحفيز تكوين اوعية دموية جديدة في الأنسجة المتضررة (Wang *et al.*, 2006) وهذه تعدُّ مهمة جداً وخاصة في حالة إلانتان إذ إن الاحتقان في الإوعية الدموية الدقيقة والإضطراب الوظيفي في عملية التجلط تسبب الذوى Ischemia في الاعضاء والأنسجة المتعددة ، ووضح الباحثون (Wang *et al.*, 2009 ; Crisostomo *et al.*, 2008) من أن التعرض لكل من عامل نخر الورم TNF- $\alpha$  ، نقض الإوكسجين Hypoxia وامتداد السكريد الشحي الجرثومي LPS

يسبب تحفيز إفراز كل من VEGF ، FGF2 و HGF من قبل الخلايا الجذعية اللحمية ومن ثم يزيد من دورها في عملية تكوين أوعية دموية جديدة داخل الأنسجة المخمجة.

## 4.12. 2 تحفيز وتنشيط الخلايا الجذعية الكامنة Activation of Resident Stem Cells

ان مجموعة عوامل النمو التي تفرزها الخلايا الجذعية اللحمية تعدُّ مهمة جداً في عملية تكوين الأوعية الدموية الجديدة داخل الأنسجة المتضررة ، كما وأنها تشارك في عملية تحفيز الخلايا الجذعية اللحمية المتواجدة في بعض الاعضاء مثل القلب ، الرئة ، الكبد والكلية (Da Silva Meirelles *et al.*, 2006) ، هذه الاعضاء تتأثر وبشكل كبير في حالة الإنتان ، لذلك فإن تحفيز الخلايا الجذعية اللحمية الكامنة في هذه الاعضاء من قبل عوامل النمو مثل ( HGF ، VEGF و IGF-1 ) المفرزة من الخلايا الجذعية اللحمية تعمل على تخفيف حالة الإضطراب الوظيفي في الاعضاء المتضررة ( Murphy *et al.*, 2013 ; Crisostomo *et al.*, 2008 )

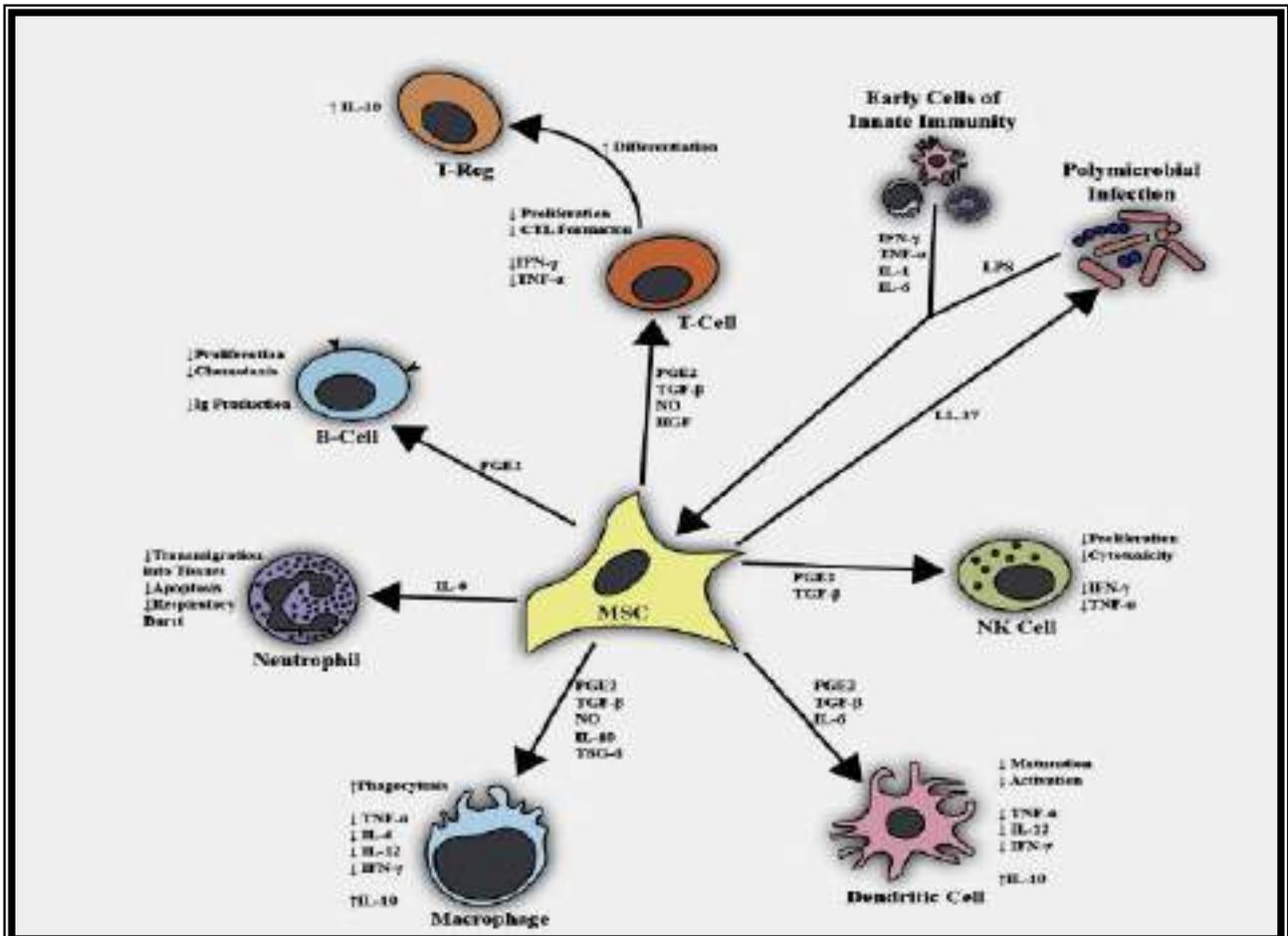
وسجل الباحث (Tang *et al.*, 2009) ، أن عامل النمو VEGF يعدُّ العامل الأساسي لتحفيز الخلايا الجذعية القلبية ، الذي اعطى تحسناً ملحوظاً في وظيفة القلب بعد إحداث احتشاء Infarction حاد موضعي . كما وسجل الباحث ( Zisa *et al.*, 2009 ) أن عامل النمو البطاني الوعائي VEGF يعدُّ عاملاً مهماً نظير الصماوي والمفرز من قبل الخلايا الجذعية اللحمية لإحداث عملية تجدد القلب Cardiac regeneration .

## 5.12. 2 تأثيرات التحوير المناعي Immune-modulatory effects

يقصد بالتحوير المناعي تحفيز او تثبيط الإستجابة المناعية، الخلوية او الخلطية او الإثنتين معاً عن الحد السوي للاستجابة المناعية . تتميز الخلايا الجذعية اللحمية بضعف التمييز المناعي Hypo-immunogenic وذلك لامتلاكها مستويات قليلة من معقدات التوافق النسيجي

MHC-II ، في حين لاتملك مستقبلات للنوع الثاني من مقدمات التوافق النسيجي MHC-II ( Mao *et al.*, 2017 ; Zhao *et al.*,2016 ) وهذه الميزة مكنت الخلايا الجذعية اللحمية لاستخدامها في العلاج الخلوي للعديد من الامراض المناعية.

أشارت مجموعة كبيرة من الدراسات والبحوث إلى أن الخلايا الجذعية اللحمية تتفاعل وبشكل مباشر مع خلايا الجهاز المناعي immune system ، لحماية المضيف المخمج بالانتان ، وكما هو موضح في الشكل (4) (Wannemuehler *et al.*, 2011). وتمتلك الخلايا الجذعية اللحمية بعض الخصائص المثبطة للمناعة immunosuppressive التي تعد مهمة في حالة الانتان ، إذ أن الاشارات النظرية الصماوية والمفرزة من قبل هذه الخلايا الجذعية أظهرت تأثيرات مثبطة للسايتوكينات إلتهابية التي تقوم بإفرازها الخلايا البلعمية ( Nemeth *et al.*, 2009 ; Aggarwal and Pittenger , 2005 ) وكذلك تمنع الإنجذاب الكيميائي للعدلات (Gupta *et al.*, 2007) Neutrophil chemotaxis



الشكل (3) : التأثيرات المناعية المحورة للخلايا الجذعية اللحمية Immune-modulatory effects of Mesenchymal stem cells

ان حدوث الحِالاتِ الالتهابية مثل الإلتان يسبب تحفيز العدلات لا فرار وتحرير السايٲوكينات البادئة للالتهاب Pro-inflammatory cytokines ، وهجرة العدلات بأعداد كبيرة إلى الأنسجة المتضررة ومن ثم إفرازها للأنزيمات الحالة وجذور الإوكسجين الحرة التي تسبب حدوث حالة الخل الوظيفي في الاعضاء المختلفة ( Seeley *et al.*, 2012 ). إذ أظهرت دراسات عديدة قابلية الخلايا الجذعية للحمية على تقليل هجرة العدلات ومن ثم تقليل الإذى في كل من الرئة ( Xu *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*,2017 ) ، الكبد والكلية ( Nemeth *et al.*, 2009 ) ، حيث سجل Ortiz وجماعته (2007) قدرة الخلايا الجذعية للحمية على تقليل اذى الالتهاب في الفئران المصابة بالتليف الرئوي ، فضلا عن انخفاض تراكم الكولاجين والتليف داخل الرئة من خلال دور الخلايا الجذعية للحمية في تثبيط تحرير الانترلوكين IL-1 $\alpha$  وكذلك TNF- $\alpha$  من خلال تحرير مضادات مستقبلات هذه الانترلوكينات IL-1 receptor antagonist . كما ولاحظ كل من Semedo وجماعته (2009) وكذلك Togel وجماعته (2005) ان حقن الخلايا الجذعية للحمية في الفئران المصابة بأذى الكلية سبب انخفاض في السايٲوكينات البادئة للالتهاب مثل IL-1 $\beta$  ، TNF- $\alpha$  و IFN- $\gamma$  وكذلك لوحظ انخفاض في مستويات اوكسيد النتريك NO والجذور الحرة ، ووضحت نتائج هذه البحوث قدرة الخلايا الجذعية للحمية على تحويل وتحويل الالتهاب من نوع الخلايا اللمفية المساعدة النوع الاول Pro-inflammatory T<sub>H</sub> I ، الى النوع الثاني من الاستجابة الالتهابية المعتمدة على الخلايا الالتهابية المساعدة المضادة للالتهاب Anti-inflammatory T<sub>H</sub> II (Wise and Ricardo ,2012).

تلعب الخلايا الجذعية دوراً مهماً مع المناعة الفطرية و المكتسبة إذ أظهرت دراسات دور الخلايا الجذعية في تحفيز او تثبيط تكاثر ونضوج للعديد من الخلايا المناعية مثل الخلايا اللمفية بنوعيتها T and B –lymphocytes وكذلك الخلايا الشجرية Dendritic cells الخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cells فضلا عن الخلايا البلعمية والعدلات ( Gao *et al.*,2016 ; Murphy *et al.*, 2013 ; Ma *et al.*, 2013 ; Li and ) (Ikehara, 2013).

سجل العديد من الباحثين قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على تثبيط تكاثر ونضوج الخلايا اللمفية ، والتي تم تحفيزها بواسطة المحفزات المناعية مثل Mitogen و Alloantigens فضلا عن قدرتها على تحفيز واستدعاء للخلايا اللمفية المنظمة Regulatory lymphocytes والتي تعتبر مهمة في الحفاظ على التوازن المناعي (Zhao *et al.*, 2016) . كما ولاحظ الباحثين مقدرة الخلايا الجذعية اللحمية على تثبيط تكاثر الخلايا القاتلة الطبيعية من خلال تثبيط افرازه الساييتوكينات الالتهابية ، حيث بين Spaggiari وجماعته (2006) ان الخلايا الجذعية اللحمية تقوم بتثبيط تحرير IL-2 والذي يحفز نضوج وتكاثر للخلايا القاتلة الطبيعية.

تقوم الخلايا الجذعية اللحمية بتنظيم نضوج وتكاثر للخلايا اللمفية B ، والتي تلعب دورا اساسيا في المناعة الخلطية ، حيث بين Corcione وجماعته (2006) دور الخلايا الجذعية اللحمية في السيطرة على تكاثر الخلايا اللمفية B من خلال تنظيم طور G0/G1 في دورة تكاثر الخلايا . كما وتلعب الخلايا الجذعية اللحمية دوراً رئيسياً في تحفيز وانتقال الخلايا البلعمية من النوع M1 الى النوع M2 ، حيث لاحظ Nemeth وجماعته (2009) ان حقن الخلايا الجذعية اللحمية داخل الجسم الحي سبب تفاعل هذه الخلايا الجذعية مع كل من وحيدات النواة في مجرى الدم والخلايا البلعمية داخل الانسجة ، مع اعادة برمجة هذه الخلايا لانتاج كميات كبيرة من الساييتوكينات المضادة للالتهاب وبخاصة IL-10 ، مع انخفاض شديد في مستويات كل من IL-6 و TNF- $\alpha$ .

### 13.2 الدراسات والبحوث حول الخلايا الجذعية في العراق

نظراً لأهمية الخلايا الجذعية ، ومن اجل مواكبة البحوث والدراسات العالمية فقد اتجه العديد من الباحثون إلى اجراء الدراسات والبحوث العلمية للخلايا الجذعية ومحاولة استخدامها في علاج العديد من الحالات المرضية

استطاع الباحث عبد الرزاق سنة (2000) ولأول مرة من استحداث مزارع مخبرية لتنمية وتوصيف الخلايا الجذعية المكونة للدم والمعزولة من الدم المحيطي وكذلك دم الحبل السري في الإنسان . أيضاً استطاعت الباحثة العزاوي سنة 2003 ولأول مرة من اشتقاق الخلايا الجذعية الجنينية من كتلة الخلايا الداخلية Inner cell mass لأريمة Blastocyte الفئران وزرعها خارج الجسم الحي ولفترات طويلة بدون الحاجة إلى استئصال المبيض ، كما استطاعت الباحثة الجماس سنة (2007) من عزل للخلايا الجذعية من دم الحبل السري في الإنسان ، كذلك نجح كل من الباحث المولى سنة (2013) والباحثة السبعواوي سنة(2013) من عزل للخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الفئران وتنميتها خارج الجسم الحي .

أما فيما يتعلق بالبحوث والدراسات حول محاولات تمايز الخلايا الجذعية إلى خلايا متخصصة مثل الخلايا العضلية والغضروفية والخلايا العصبية وغيرها ، فقد استطاعت الباحثة (Waheed) وجماعتها سنة (2010) و سنة (2011) من تمايز الخلايا الجذعية الجنينية التي تم تنميتها في المزارع النسجية خارج الجسم الحي إلى خلايا عضلية ملساء وخلايا عصبية ، إذ سجلت الباحثة امتلاك هذه الخلايا الجذعية المتميزة استجابة للواسم العصبي الذي يطلق عليه Nestin وهو عبارة عن بروتين الخيوط العصبي Neuro-filaments الذي هو احد الواسمات للخلايا الجذعية العصبية . كذلك اظهرت الخلايا الجذعية التي تمايزت إلى خلايا عضلية ملساء استجابة موجبة مع الاجسام المضادة ضد Myosin ، الذي يعد واحداً من البروتينات الرئيسة للعضلات التي تكون الخيوط العضلية Myofilamants في اللييفات العضلية myofibrils الذي يلعب دوراً مهماً في عملية تقلص وانبساط الخلايا العضلية ، واستطاع الباحث المولى سنة (2013) من احداث تمايز للخلايا الجذعية اللحمية والمعزولة من

نقي عظام الفئران إلى خلايا عضلية هيكلية ، واستخدم الباحث المجهر الإلكتروني ولاحظ تكون الليف العضلي الأسطواني Muscle-fiber متعدد النوى مع ظهور إامتدادات والاستطالات البروتوبلازمية Fillipodia التي لها دور مهم في التصاق الخلايا العضلية مع بعضها .

أما وفيما يتعلق باستخدام الخلايا الجذعية في علاج الأمراض والاعتلالات الجسمية فقد نجحت كل من الباحثة السبعاوي (2013) وكذلك الباحثة بيداء (2014) من عزل للخلايا الجذعية اللحمية والمعزولة من دم الحبل السري ومن نقي عظام الفئران ، وكذلك النجاح في تمايز هذه الخلايا الجذعية إلى خلايا شبيهة بخلايا جزر لانكرهانز في البنكرياس .

واستطاعت الباحثة السبعاوي ومحاولة لايجاد علاج لمرض السكري بالخلايا الجذعية المعزولة من المشيمة إذ تم استحداث مرض السكري في الفئران المهقاء بمادة الإلوكسان بعدها تم حقن هذه الفئران المصابة بالسكري بخلايا جذعية ، كما تمت دراسة التأثيرات النسيجية لكل من البنكرياس و الكبد في الفئران المحقونة بالخلايا الجذعية ، إذ سجلت الباحثة حدوث تحسن على مستويات الكلوكوز للفئران المحدث بها داء السكري والمحقونة بالخلايا الجذعية وكذلك حدوث تجدد للجزيرات والعنبيات في البنكرياس كما ولوحظ الترتيب الطبيعي للخلايا الكبدية وإعادة اصلاح لنسيج الكبد.

## الفصل الثالث

## Materials and Methods المواد وطرائق العمل

## 1.3 الأجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة :

الشركة المصنعة والمنشأ	الأجهزة والمواد	ت
China-Hana	PH meter جهاز قياس الأس الهيدروجيني	1
korea-labtech	Oven فرن كهربائي	2
China-SonyCyber-shot	Digital camera كاميرا رقمية	3
Japan-Olympus-IM	Light Microscope مجهر ضوئي اعتيادي	4
Memmert- Germany	جهاز تقطير	5
Olympus - Germany	Inverted Microscope مجهر ضوئي معكوس	6
Germany-laboveoge	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	7
korea-labtech	Autoclave موصدة	8
korea-labtech	Sensitive Balance ميزان حساس	9
Germany-Sartorius stedium	Millipore paper أوراق ترشيح دقيقة 0.22 ملم	10
Denark-Nunc	دوارق الزرع النسيجي نبيدة 25سم- Disposable tissue culture flasks 25cm	11
Germany-Neubauer	Hemocytometer chamber شريحة عد خلايا الدم	12

Leitz – Germany	Microtome	المشراح	13
Webeco–Germany	Heater	مسخن	14
Shandon– England	Histokinette	جهاز تمرير العينات النسجية	15
Yamato – Japan	Incubator	حاضنة	16
Optika – Italy	Light Microscope	مجهر ضوئي	17
JRZ PlastiLab – Lebanon	Plastic peteri dish	أطباق بتري بلاستيكية	18
China	Syringes: 1 ml, 3ml, 5 ml	سرنجات	19
USA–Sigma	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid (EDTA)	ايتيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك	20
USA–Sigma	Trypsin	إنزيم التريسين	21
USA–Santa cruse	Fetal Calf Serum	مصل الجنين البقري	22
USA–US Biology	Dulbecco's Modified Eagle's Media(DMEM)	وسط دولبيكو الزرعي المحور	23
Ajanta – India	Penicillin and Streptomycin	البنسلين والستربتومايسين	24
Sigma –USA	Hepes Buffer	دارئ هبس	25
Sigma –USA	Non–essential amino acid	الاحماض الامينية غير الاساسية	26

Fluka- Germany	Trypan blue stain	صبغة التريبان الزرقاء	27
Sigma -USA	L- Glutamine	الكلوتامين	28
BDH-England	كلوريد الصوديوم NaCl، فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين NaHPO4، فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجي NaH2Po4		29
Haman – U.K	كحول الايثانول، الزايلزل، كلوروفورم، فورمالين		30

### 2.3 الحيوانات المختبرية

تضمنت الدراسة استخدام الجرذان البيضاء Albino Rats ، البالغة بعمر (5-6) اسبوع ، تراوحت اوزانها ما بين (300-350) غم ، التي تم الحصول عليها من بيت الحيوانات التابع لكلية الطب البيطري جامعة الموصل ، واخضعت الحيوانات طول مدة الدراسة لظروف مختبرية موحدة من درجة الحرارة والإضاءة والتهوية ، وتم تربيتها بأقفاص بلاستيكية خاصة مهيأة لهذا الغرض واعطيت الماء والعلف بشكل مستمر .

### 3.3 ظروف زراعة وتنمية الخلايا الجذعية

تم انجاز الجزء العملي وزراعة الخلايا الجذعية في المختبر المركزي التابع لكلية الطب البيطري جامعة الموصل وتحت ظروف مختبرية معقمة ، إذ تم تعقيم جميع الزجاجيات والادوات الجراحية المستخدمة بالمؤصدة Auto calve وبدرجة حرارة (121) م ولمدة (30) دقيقة وتحت ضغط 15 باوند/ انج مربع .

تم تعقيم المحاليل والأوساط الزرعية باستخدام مرشحات ورقية Millipore filter ، ذات نفاذية (0.22) مايكروميتر ، وتم حضن Incubation دوارق الزرع النسجي باستخدام Candle

Jar ، وذلك لتوفير غاز CO2 وتحت درجة حرارة 37م الضرورية لنمو وتكاثر الخلايا الجذعية (السباعوي ، 2013).

### 4.3 تحضير محاليل الزرع :

#### 1.4.3 تحضير وسط الزرع Dulbecco 's Modification Eagle's Media High Glucose (DMEM)

تم في هذه الدراسة استخدام الوسط (DMEM) لزرع وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية (MSCs) المعزولة من نقي عظام الجرذان ، وتم تحضير الوسط تبعاً لتعليمات الشركة المصنعة ، إذ تم إذابة (13.54) غم من مسحوق الوسط في (900) مل ماء مقطر منزوع الايونات إذ تم إذابة الوسط بالمزج بواسطة جهاز المحرك المغناطيسي Magnetic Stirrer وبدون تسخين بعدها تم إضافة (3.7) غم من مسحوق بيكاربونات الصوديوم Na2Hco3 مع الاستمرار في المزج ، وتم ضبط الاس الهيدروجيني PH إلى (7.3) ، بعدها تم إضافة كل من دارئ هبس Hepes buffer و L-Glutamin بنسبة (10) مل / لتر.

كما وتم إضافة الاحماض الامينية غير الاساسية Non-Essential amino acids وبنسبة (1%) ثم اكمل المحلول إلى حجم (1) لتر بإضافة الماء المقطر منزوع الايونات ، واضيف إلى الوسط الزرع المحضر المضادات الحيوية Antibiotics والمتمثلة بالستربتومايسين (100) ملغم / لتر ، والبنسلين (1000000) وحدة دولية / لتر وتم تعقيم الوسط الزرع باستخدام المرشحات الورقية الدقيقة ذات النفاذية (0.22) مايكروميتر وحفظ الوسط الزرع في حاويات بلاستيكية نظيفة ومعقمة تحت درجة حرارة (-4) م .

تم إضافة مصل الجنين البقري Fetal bovine serum إلى الوسط الزرع المحضر وبنسبة (10%) قبل إجراء عملية عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي العظم (السباعوي ، 2013 ; Pittenger *et al.*, 1999).

### 2.4.3 تحضير محلول دارى الفوسفات الملحي منزوع ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم

#### Dulbecco's Phosphate buffer solution free Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>

حضر هذا المحلول بإذابة (10) غم من مسحوق كلوريد الصوديوم NaCl مع (0.25) غم من مسحوق كلوريد البوتاسيوم KCl و (1.44) غم من مسحوق فوسفات الصوديوم الهيدروجينية المائية  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  و (0.25) غم من مسحوق فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ، في (1) لتر من الماء المقطر منزوع الايونات ، وبعد الإذابة تم ضبط الاس الهيدروجيني ال (7.3) وتم تعقيمه باستخدام المرشحات الورقية الدقيقة ذات النفاذية (0.22) مايكروميتر وحفظ في قناني معقمة محكمة الغلق بدرجة حرارة (4) م ، استخدم هذا المحلول في تحضير انزيم (الترسين - EDTA) (Rolletschek et al., 2008).

### 3.4.3 تحضير محلول انزيم الترسين - ايثيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك

#### ( Trypsin - EDTA )

حضر هذا المحلول عن طريق إذابة (0.25) غم من مسحوق انزيم الترسين في (100) مللتر من دارى الفوسفات منزوع ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم ، ايضاً تم إذابة (0.02) غم من مسحوق EDTA ، في (100) مللتر من دارى الفوسفات منزوع ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم . تم مزج كميات متساوية وبنسبة (1:1) من كل من محلول الترسين ومحلول EDTA وتم ضبط الاس الهيدروجيني إلى (7.6) وعقم محلول الانزيم بالترشيح بالمرشحات الورقية ذات نفاذية (0.22) مايكروميتر (السبعواوي ، 2013 ; Pollared and Walker , 1997) .

### 4.4.3 تحضير محلول صبغة التريبان الزرقاء Trypan Blue

تم تحضير محلول صبغة التريبان الزرقاء (0.4%) بإذابة (0.4) غم من مسحوق صبغة التريبان الزرقاء في (100) مللتر من محلول الملح الفسلجي . استخدمت هذه الصبغة لتحديد نسبة الخلايا الجذعية الحية خلال عملية عد الخلايا الجذعية للحمية ، إذ ان الخلايا الحية لا تأخذ الصبغة الزرقاء على عكس الخلايا الجذعية الميتة التي تأخذ لون الصبغة الازرق (Bancroft and Stevens , 1989).

### 5.3 عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجردان

استخدمت طريقة ( السبعوي ، 2013 ؛ المولى ، 2013 ؛ Nadri *et al.*, 2007 ) لعزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الفخذ والساق في الجردان ، تم قتل الجردان باستخدام الايثر ، بعدها عقت بالكحول الايثيلي (70%) ، ثم عمل شق طولي في الجلد اسفل التجويف البطني إلى مفصل القدم مع ازالة الجلد المحيطي بهذه المنطقة ، بعدها تم قطع الاطراف الخلفية للجرذ من منطقة الجذع ( منطقة التقاء رأس عظم الفخذ بالحوض ) ، ووضعت في طبق بتري معقم حاوي على الوسط الزرعي DMEM المضاف إليه مصل الجنين البقري وكذلك المضادات الحيوية .

وضعت عظمي الفخذ والساق في طبق بتري معقم وتم تنظيف وازالة الانسجة والعضلات المحيطة بواسطة المشروط الجراحي وتم فصل عظم الفخذ عن عظم الساق ووضع كل منهما في طبق بتري منفصل حاوي على الوسط الزرعي ، قطع الجزء العلوي والسفلي من عظم الفخذ والساق وتم مسك العظم بواسطة ملقط معقم وبشكل عمودي مع دفع Flushing الوسط الزرعي وبأستخدام محقنة نبيذة بقوة من النهاية الامامية العلوية ليخرج الوسط الزرعي من النهاية الاخرى للعظم حاملا معه نقي العظم الذي تم جمعه في طبق بتري معقم ، كررت هذه العملية حتى فرغت قسبة العظم من النقي وبدت بيضاء اللون.

جزئت كتل نقي العظم إلى اجزاء صغيرة باستعمال ماصة باستور معقمة وذلك للحصول على معلق الخلايا Cell Suspension ، بعدها تم نقل هذا المعلق الخلوي إلى دوارق الزرع النسجي Tissue Culture Flasks حجم (25) ملتر ، مع اكمال حجم المعلق الخلوي إلى (5) ملتر بإضافة الوسط الزرعي واغلقت فوهة دورق الزرع النسجي بأحكام وفي ظروف معقمة وسجل عليها تاريخ الزرع ، وحضنت بدرجة حرارة (37)م<sup>0</sup> في دورق Candle Jar لتوفير نسبة (5%) من غاز ثاني اوكسيد الكربون (المولى ، 2013) . تم إجراء فحص يومي لدوارق الزرع النسجي لمتابعة نمو ونشاط الخلايا الجذعية مع إجراء تغيير للوسط الزرعي كل (2-3) أيام وذلك بإزالة نصف الوسط الزرعي القديم واستبداله بوسط زرعي جديد ، وتم تصوير الخلايا الجذعية اللحمية باستخدام المجهر المقلوب Inverted Microscope وكاميرا رقمية .

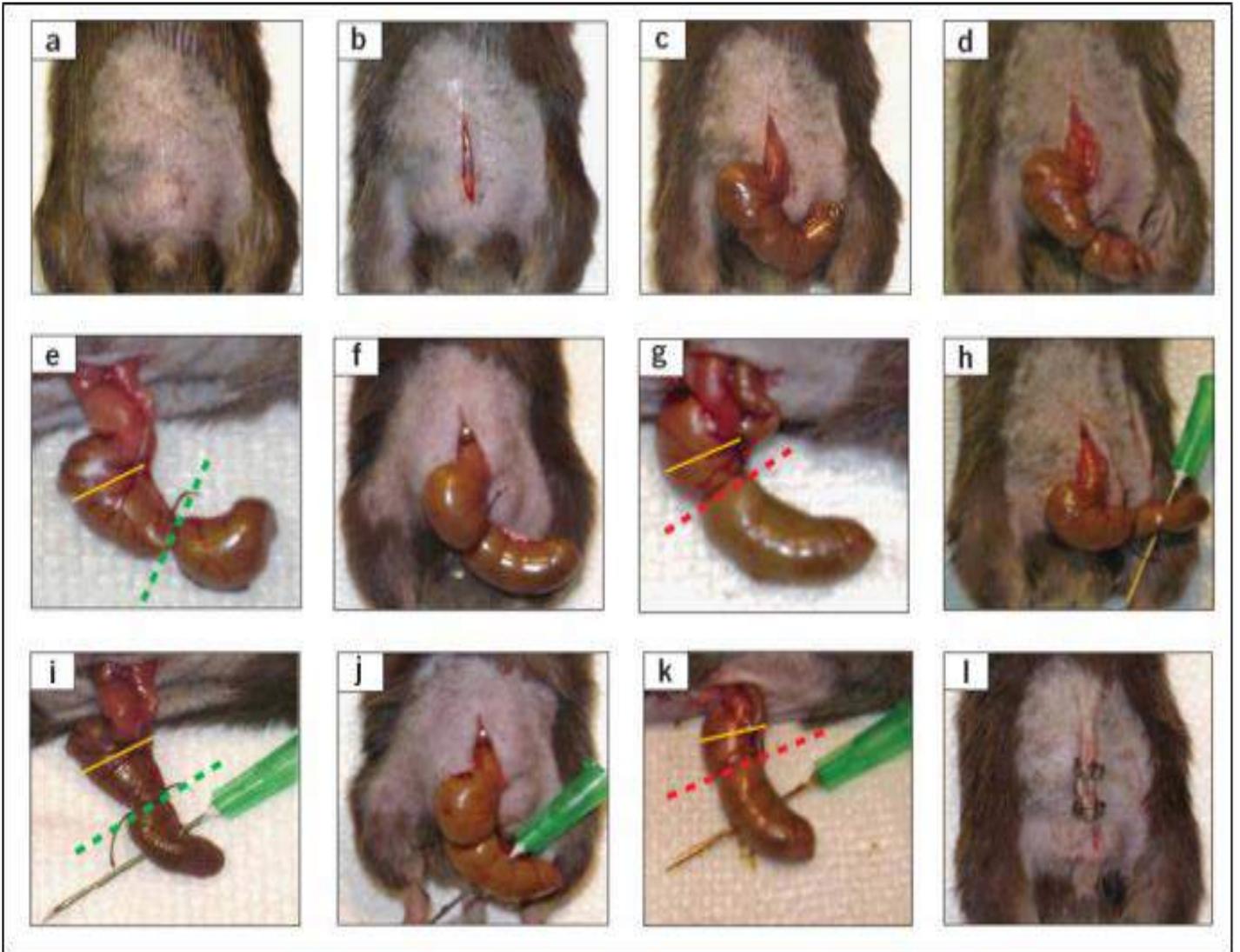
### 6.3 حصاد الخلايا الجذعية اللحمية وحساب أعدادها Harvesting and counting Mesenchymal stem cells

تم جمع وحصاد الخلايا الجذعية اللحمية بعد مرور (14) يوم من الزراعة الأولية وعند وصول الخلايا الجذعية لنسبة احتشاد confluency تصل إلى (70-90%) في دوارق الزرع النسجي وبالاعتماد على طريقة (Pollared and Walker , 1997) و (السبعوي، 2013) وكما يلي :

1. تم التخلص من الوسط الزرعى بسكبه خارج دورق الوسط الزرعى .
2. غسلت الخلايا الجذعية اللحمية الملتصقة بدائى الفوسفات الملحي منزوع أيونات الكالسيوم والمغنسيوم ، وذلك بإضافة هذا الدائى إلى دورق الزرع النسجي في الجهة المعاكسة لجهة التصاق الخلايا الجذعية اللحمية مع الرج الخفيف للدورق لأكمال عملية الغسل .
3. بعد التخلص من دارئ الفوسفات الملحي ، تم إضافة محلول انزيم التريسين - EDTA إلى دوارق الزرع النسجي وحضنت بدرجة حرارة (37)م° ولمدة (5-10) دقائق .
4. تم فحص الخلايا الجذعية بواسطة المجهر المقلوب للتأكد من قلع وحصاد الخلايا الجذعية ، بعدها تم إضافة (5) مللتر من الوسط الزرعى الحاوي على مصل الجنين البقري لغرض تثبيت عمل الانزيم والحفاظ على الخلايا الجذعية .
5. تم حساب أعداد الخلايا الجذعية المحصودة عن طريق مزج 0.25مل من معلق الخلايا المحصودة مع محلول صبغة التريبيان الزرقاء وبنسبة (1:1) ، وتم أخذ (10) مايكروليتر من هذا المحلول الخلوي الممزوج ووضع على طرف الهيموسيتوميتر Hemocytometer لغرض حساب اعداد الخلايا الحية التي لا تأخذ الصبغة الزرقاء في كل من المربعات الكبيرة ، وتم ضرب معدل مجموع هذه الخلايا المحسوبة  $10^4 \times$  ، ليعطي عدد الخلايا الحية في كل (1) مللتر من المعلق الخلوي ( Louis and Siegal , 2011 ; المولى ، 2013) .
6. تم سكب معلق الخلايا المقلوعة في انبوب اختبار معقم (10) مللتر ، وتم طرده مركزياً بسرعة (3000) دورة / دقيقة ولمدة (5) دقائق .
7. تم التخلص من الراشح وغسل الراسب بمحلول دارئ الفوسفات الملحي منزوع أيونات الكالسيوم والمغنسيوم ، بعدها تم زرع الخلايا المحصودة في دورقين منفصلين مع إضافة الوسط الزرعى DMEM والحضن بنفس الظروف السابقة .

### 7.3 أحداث الانتان بطريقة ربط الاعور وثقبه Cecal ligation and puncture sepsis

تم إحداث الانتان المتعدد الجراثيم Poly-microbial sepsis باستخدام نموذج وضعه الباحثون (Wichterman *et al.*, 1980) الذي يتضمن التدخل الجراحي لربط الاعور وثقبه لأحداث التهاب الخلب الغائطي Fecal peritonitis ومن ثم يتطور إلى حالة الانتان وكما هو موضح بالشكل (4) .



الشكل (4) : مراحل عملية اجراء عملية Cecal ligation and puncture (CLP) لأحداث الانتان Sepsis (Rittirsch *et al.*, 2009 )

استخدم الكيتامين (80-100) ملغم/كغم من وزن الجسم ، والزيازين (5-10) ملغم/كغم من وزن الجسم لتخدير الحيوانات . تم تحضير منطقة العملية الجراحية بإتباع مبادئ الجراحة الاساسية ، إذ تم قص وحلاقة المنطقة الوسطى من البطن وتطهيرها بالكحول (70%) ، وباستخدام المشروط الجراحي تم عمل شق طولي (2) سم فوق منطقة الخط الوسطي Midline incision ، وكذلك تم عمل شق اخر في غشاء الخلب بعد قص عضلات البطن للدخول إلى التجويف الخليبي مما يسمح للوصول إلى الاعور واخراجه مع ترك ما تبقى من الامعاء داخل التجويف البطني . تم دفع محتوى الامعاء (البراز) باتجاه نهاية الاعور ، بعدها ربط الاعور Cecum Ligation بواسطة خيط جراحي (سلك) بالقرب من الفتحة اللفائفية الاعورية مع عمل (3) ثقب Puncture في جدار الاعور باستخدام ابرة قياس (21) وذلك للسماح بخروج مكونات الامعاء خارج الاعور ، بعد ذلك اعيد الجزء المربوط من الاعور إلى داخل التجويف الخليبي واغلقت البطن بواسطة الخياطة الجراحية وبشكل بسيط ومتواصل Simple continues إذ تمت خياطة العضلات مع البطن ، وتمت خياطة الجلد بشكل بسيط ومتقطع Simple interrupted .

تم توفير الظروف المناسبة للحيوانات لما بعد العملية الجراحية من درجة حرارة وماء وعلف مع حقن الحيوانات بالملح الفسلجي Normal saline وبدرجة حرارة (37) م° تحت الجلد وبجرعة (5) مللتر/ حيوان .

كما وتم عمل مجموعة سيطرة موجبة لعملية احداث الانتان السابقة التي يطلق عليها Sham-operated group ، التي تضمنت فتح التجويف البطني وحسب الطريقة السابقة مع اخراج جزء الاعور من الامعاء خارج التجويف الخليبي ولكن بدون إجراء عملية ربط الاعور أو ثقبه ، بعدها تم ارجاع الاعور إلى داخل التجويف الخليبي وعلق منطقة الجرح بنفس الخطوات الجراحية السابقة مع توفير الظروف المناسبة للحيوانات لما بعد العملية الجراحية من درجة حرارة وماء وعلف مع حقن الحيوانات بالملح الفسلجي وبدرجة حرارة (37) م° تحت الجلد وبجرعة (5) مللتر/ حيوان .

## 8.3 سحب الدم

بعد تخدير الحيوانات بالايثر ، تم سحب الدم من زاوية العين باتجاه الضفيرة الوريدية خلف مقلة العين بواسطة انبوب شعري ووفقاً لطريقة (Waynfooth , 1980) ، ثم جمع الدم في أنابيب اختبار سعة (5) مللتر حاوية على مانع التخثر EDTA لغرض قياس صورة الدم .

كما وتم جمع جزء آخر من الدم في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة غير حاوية على مانع التخثر لغرض الحصول على مصل الدم لغرض قياس مستوى بروتين سي التفاعلي C- Reactive protein ، وتم حفظ عينات مصل الدم في انابيب محكمة الغلق وفي درجة (4-) م ° .

## 9.3 المعايير المستخدمة في الدراسة

**1.9.3 فحوصات صورة الدم :** تم استخدام جهاز Blood Coulter لقياس صورة الدم ، إذ يعطي الجهاز صورة كل من العدد الكلي لكريات الدم الحمر والبيض والنسب المئوية لخلايا الدم البيض المختلفة ، فضلاً عن مستوى خضاب الدم والعدد الكلي للصفائح الدموية وحجم الخلايا المرصوصة .

**2.9.3 قياس مستوى بروتين سي التفاعلي C- Reactive protein :** تم استخدام عدة الاختبار الجاهزة من شركة Plasmatec – England ، التي تستخدم للكشف عن وقياس مستوى بروتين سي التفاعلي ، إذ تعمل بطريقة اللاتكس Latex test . وتتضمن طريقة العمل لهذا الاختبار نوعين من الفحص ، النوع الاول هو الفحص النوعي Qualitative test الذي تم إجراءه بمزج كمية من المصل مع نفس الكمية من اللاتكس الذي يحتوي على حبيبات مغلفة بأجسام مضادة للبروتين C- واجري الاختبار بدرجة حرارة الغرفة على شريحة خاصة للفحص مع التحريك لمدة دقيقتين ، وعند حدوث التلازن يدل ذلك قراءة موجبة التي تدل على ان مستوى البروتين هو اكثر من 6 ملغم/لتر . اما عند عدم حصول التلازن فهذا يدل على أن مستوى البروتين هو أقل من ذلك ، وتم مقارنة القراءات مع السيطرتين الموجبة والسالبة التي تأتي مع عدة الاختبار . أما النوع الثاني من الفحص الشبه نوعي Semi quantitative test فتم إجراءه على النماذج الموجبة للفحص الاولي لتحديد مستوى البروتين ، إذ تم إجراء تخافيف ثنائية

للمصل مع المحلول الملحي المرفق بعدة الاختبار الذي تم تخفيفه بإضافة جزء منه مع (9) أجزاء من الماء المقطر للحصول على محلول التخفيف وتم إجراء الفحص مع تخفيف المصل ويعد آخر تخفيف سبب التلازن هو القياس شبه الكمي بعد ضرب رقم التخفيف بالرقم (6) ومقاساً بالملغرام / لتر .

### 3.9.3 دراسة التغيرات المرضية : تضمنت دراسة التغيرات المرضية على ما يأتي :

- التغيرات المرضية العيانية **Gross pathological changes** ، إذ تم إجراء الصفة التشريحية لجميع الجرذان المستخدمة في الدراسة بعد تخديرها بالايثر ، مع تسجيل التغيرات المرضية العيانية في الاعضاء الداخلية . كما وتم اخذ نماذج من انسجة كل من الرئة ، الكلية والكبد ووضعت في محلول الفورمالين الدارئ المتعادل (10%) لغرض إجراء الفحوصات المرضية النسجية.
- التغيرات المرضية النسجية **Histopathological changes** ، إذ تم وضع عينات الرئة ، الكلية والكبد والامعاء في الفورمالين الدارئ المتعادل لغرض إجراء عمليات تحضير المقاطع النسجية ، وحضرت الشرائح النسجية باتباع طريقة الباحثين Drury and Wallington (1980) لتحضير المقاطع النسجية وتميرها بالكحولات والزليلول ، ثم غمرت بشمع البارافين وقطعت بسمك (5-6) مايكروميتر بجهاز المشراح Microtome لغرض الحصول على مقاطع نسجية التي تم صبغها بملون الهيماتوكسلين وملون الايوسين Haematoxyline and Eosin stain

تم ايضاً استخدام ملون كرام المحور للنسيج (براون وبرين) Modified Tissue gram stain التي تستخدم لتلوين الجراثيم في داخل المقاطع النسجية المحضرة (Luna , 1968) . إذ تظهر الجراثيم الموجبة للكرام G+ بلون ازرق غامق ، في حين تظهر الجراثيم السالبة للكرام G- بلون احمر ، أما باقي النسيج فيظهر بلون اصفر . وتم تصوير المقاطع النسجية المختلفة باستخدام مجهر ضوئي وكاميرا رقمية مجهزة لهذا الغرض (Luna , 1968).

### 10.3 التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات الخاصة بالمجموعات الحيوانية المختلفة إحصائياً باستخدام اختبار تحليل التباين One way analysis of variance ثم أخضعت النتائج لاختبار الفرق المعنوي الأدنى Least significant difference (LSD) test واختبار Dunnet للمقارنة مع مجموعة السيطرة، وقد استخدم برنامج التحليل الإحصائي SPSS في تحليلها وكان مستوى الاختلاف لجميع الاختبارات عند مستوى احتمالية أقل من  $(P < 0.05)$  (Petrie and Watson, 1999).

## 11.3 محاور الدراسة

## 1.11.3 المحور الأول : عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجرذان

عزلت الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الفخذ والساق للجرذان ، وتم تنميتها خارج الجسم الحي داخل دوارق الزرع النسجي وباستخدام الوسط الزرعي DMEM من اجل تنمية وتكاثر هذه الخلايا الجذعية اللحمية لغرض استخدامها في المحور الثالث

## 2.11.3 المحور الثاني :

احداث الأذى في مختلف أعضاء وانسجة الجسم باستخدام الانتان متعدد الجراثيم **polymicrobial Sepsis** والمحدث تجريبياً عن طريق عملية ربط الاعور وثقبه

**Cecal ligation and Puncture**

استخدام في هذا المحور 75 جرذ وقسمت عشوائيا إلى ثلاث مجاميع وكما يلي :

المجموعة الاولى : مجموعة السيطرة (السالبة) ، وتعطى ماء وعلف طول مدة الدراسة .

المجموعة الثانية : مجموعة السيطرة(الموجبة) تسمى sham- operated group

المجموعة الثالثة : مجموعة الانتان المحدث جراحيا عن طريق CLP .

وقد اعتمدت المعايير الاتية لتقييم هذا المحور :

1- تحديد نسبة البقاء على قيد الحياة Survival rate .

2- دراسة التغيرات المرضية العيانية و النسجية لكل من الكبد ، الكلية والرئة والامعاء .

## 3.11.3 المحور الثالث :

تأثير الخلايا الجذعية واستخدامها الحد من الآفات والاذى الناجم عن الانتان ، إذ سوف يتم استخدام 60 جرذ ، تقسم عشوائيا إلى ثلاث مجاميع :

المجموعة الاولى : مجموعة سيطرة ( 20 حيوان )

المجموعة الثانية : تم معاملة جرذان هذه المجموعة جراحياً لاحداث الانتان (20 حيوان) .

المجموعة الثالثة : تم استخدام (20) جرذا ، إذ إن هذه المجموعة عوملت جراحياً لإحداث الانتان بالطريقة نفسها في جرذان المجموعة الثانية ، وبعد 3 ساعة تم حقن الجرذان بالخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي العظم ( $2.5 \times 10^5$ ) ، وبجرعة (0.5 مل لكل حيوان) عن طريق الحقن داخل الوريد الذيلي (Wannemuehler *et al.* , 2012).

وقد اعتمدت المعايير الآتية لتقييم هذا المحور :

- 1- تحديد نسبة البقاء على قيد الحياة Survival rate .
- 2- تحليل صورة الدم الكاملة Complete blood picture .
- 3- قياس مستوى البروتين التفاعلي C- Reactive protein
- 4- دراسة التغيرات المرضية العيانية والنسجية لكل من الكبد ، الكلية والرئة .

## الفصل الرابع النتائج

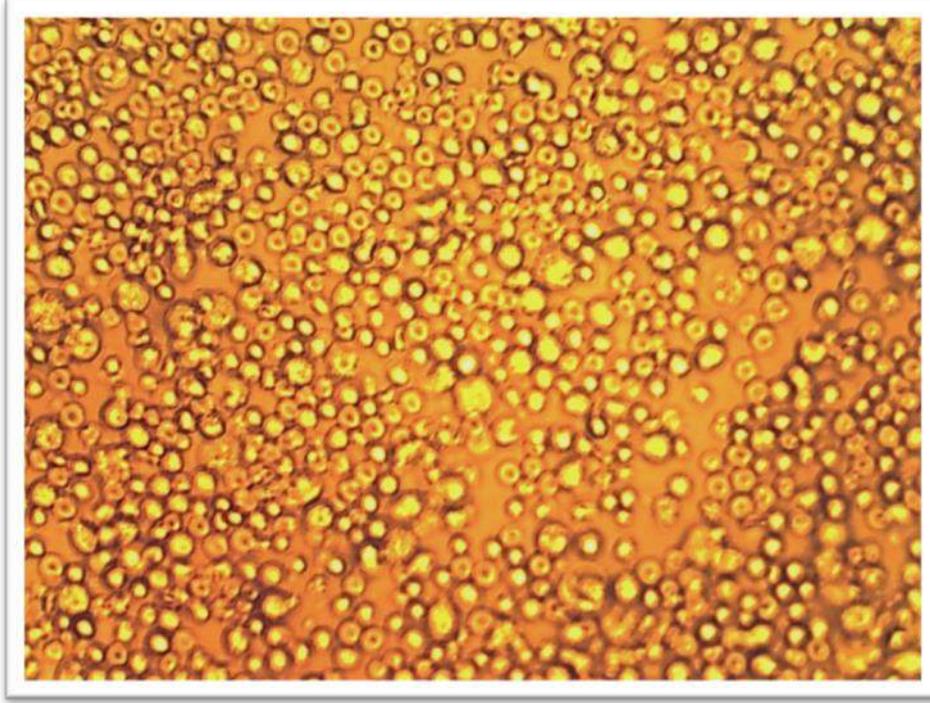
### 1-4 المحور الاول : عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظم الجردان

ظهرت خلايا نقي عظم الفخذ للجرذان بعد عزلها على شكل معلق خلوي طافي في دورق الزرع النسيجي باستخدام الوسط الزرع DMEM-high glucose ، والذي يعتبر الوسط الزرع الخاص بعزل الخلايا الجذعية اللحمية ، إذ احتوى هذا المعلق على كل من الخلايا الجذعية اللحمية التي عادةً ما تكون أعدادها قليلة جداً مقارنة بالخلايا الجذعية المكون للدم التي تواجدت أيضاً في المعلق الخلوي ، فضلاً عن باقي خلايا نقي العظم الاخرى(الشكل 5) .

تم ملاحظة الخلايا باستخدام الفحص بالمجهر المقلوب ، إذ لوحظ وبعد مرور 24 ساعة من الزرع الاولي استطالة مع استقرار لبعض من خلايا المعلق والتصاقها في قاع دورق الزرع النسيجي ، بينما لوحظ أن باقي الخلايا كانت طافية في الوسط الزرع (الشكل 6 ) ، وبعد مرور 3 أيام من اجراء عملية الزرع الاولي لوحظ التصاق بعض الخلايا الجذعية اللحمية في قاع دورق الزرع النسيجي ، التي اتصفت بشكلها المغزلي الشبيه بخلايا الارومة الليفية مع وجود بروزات بروتوبلازمية احادية اوثنائية القطب ممتدة من جسم الخلية الجذعية التي قد تمتد لتتصل مع خلايا جذعية اخرى قريبة (الشكل 7 و 8 ) ، وخلال هذه المدة أمكن تمييز طبقتين خلويتين ، الاولى وهي طبقة الخلايا الجذعية اللحمية الملتصقة بقاع دورق الزرع النسيجي أما الطبقة الثانية فهي عبارة عن طبقة من الخلايا الجذعية المكونة للدم الكروية وكذلك باقي خلايا نقي العظم والمعلقة في الوسط الزرع التي لوحظ تناقصها وبشكل تدريجي مع كل تغيير للوسط الزرع (الشكل 9 و 10) .

بعد مرور 7 ايام من عملية الزرع لوحظ تكوين مستعمرات خلوية التي هي عبارة عن تجمعات من الخلايا الجذعية اللحمية وهي تعتبر مؤشراً مظهرياً للتأكد من هوية الخلايا الجذعية اللحمية التي يطلق عليها وحدات المستعمرات المكونة للارومات الليفية CFU-F (الشكل 11 و 12) ، إذ لوحظ على هذه المستعمرات التوسع والكبر تدريجياً من خلال الزيادة في عدد الخلايا والناجمة من زيادة فعاليتها وحيوتها ، كما ولوحظ هجرة أعداد من الخلايا الجذعية اللحمية إلى مناطق جديدة من دورق الزرع إذ تميزت بشكلها الكروي والصغيرة الحجم ثم بدأت بالالتصاق وتكوين خلايا جذعية شبيهة بالارومات الليفية ذات بروزات طويلة أو قصيرة (الشكل 13).

بعد مرور 14 يوم من الزرع لوحظ تكون طبقة أحادية محتشدة ومتجانسة من الخلايا الجذعية اللحمية بنسبة 80-90 % من الاحتشاد (صورة 14 ) ، وخلال هذه المدة تم قلع وحصاد الخلايا الجذعية وكذلك حساب أعدادها ومن اجل زراعتها ثانوياً وفي دورقين منفصلين من اجل ادامتها والمحافظة على حيوتها وكذلك من اجل تكاثرها وزيادة اعدادها. إذ لوحظ وبعد اجراء عملية الزرع الثانوي للخلايا الجذعية اللحمية زيادة في نشاطها من خلال التصاقها بدورق الزرع النسجي مع زيادة في كثافة الخلايا .



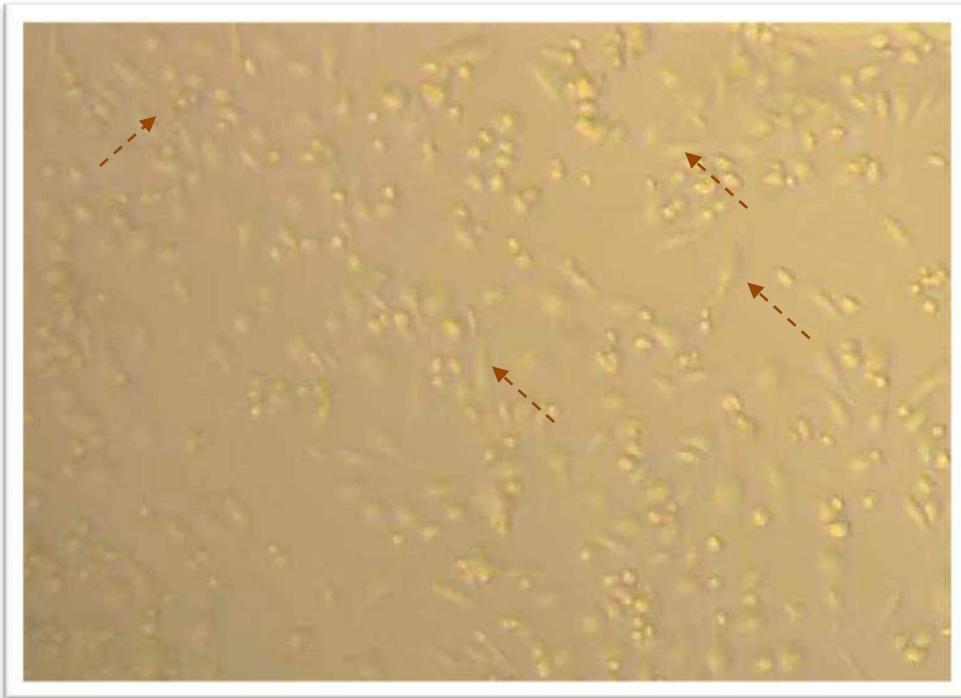
شكل (5) : مزرعة خلايا نقي عظم في بداية الزرع توضح مختلف خلايا نقي العظم والتي تكون معلقة في الوسط الزرع (400 x)



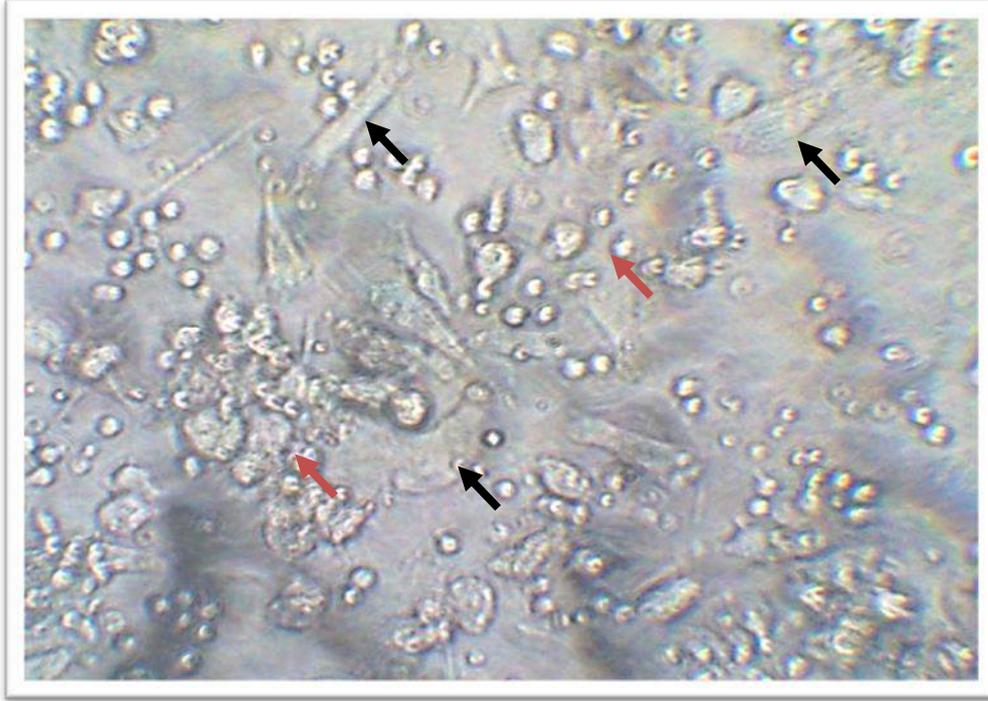
شكل (6) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد 24 ساعة من الزرع الاولي ، يوضح حدوث استتالة والتصاق لبعض الخلايا داخل الوسط الزرع (400x)



شكل (7) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد 3 أيام من الزرع الأولي ، يبين التصاق لبعض الخلايا الزرع النسجي والتي اتصفت بشكلها المغزلي ، في حين أن باقي الخلايا ظلت طائفة في المعلق الخلوي (400 x).



شكل (8) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد 3 أيام من الزرع الأولي ، يبين حدوث التصاق العديد من الخلايا ذات الشكل المغزلي بقاع دورق الزرع النسجي الشبيه بخلايا الارومة الليفية مع وجود بروتات بروتوبلازمية احادية او ثنائية القطب ممتدة من جسم الخلية (100x) .



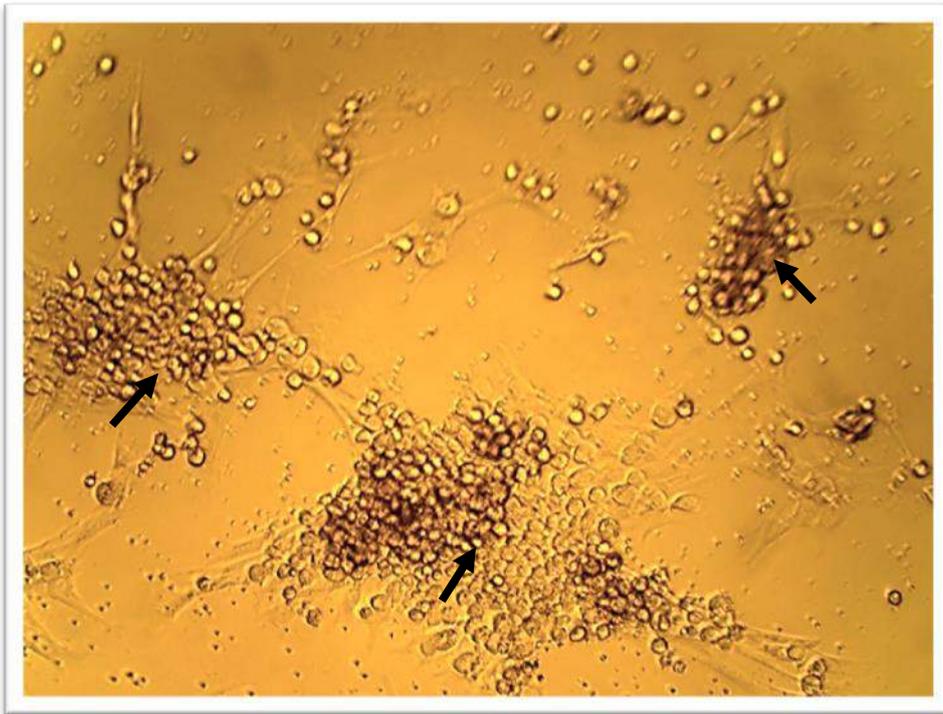
شكل (9) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 3 أيام من الزرع الأولي ، يلاحظ وجود طبقتين من الخلايا هما الطبقة الملتصقة (↙) والطبقة الطافية (↘) (400X).



شكل (10) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 3 أيام من الزرع الاولي ، يلاحظ زيادة في تكاثر الخلايا الجذعية اللحمية ، مع قلة في خلايا نقي العظم الاخرى (400X)



شكل (11) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 7 أيام من عملية الزرع الاولي ، تكوين مستعمرات خلوية (100X).



شكل (12) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 7 أيام من عملية الزرع الاولي ، يلاحظ تكوين مستعمرات والتي هي عبارة عن تجمعات من الخلايا الجذعية اللحمية والتي يطلق عليها وحدات المستعمرات المكونة للارومات الليفية CFU-F (100X).



شكل (13) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 7 أيام من الزرع الاولي ، توضح الشكل المغزلي للخلايا الجذعية اللحمية (  ) مع تواجد لخلايا جذعية لحمية صغيرة الحجم وكروية الشكل (  ) (400x) .



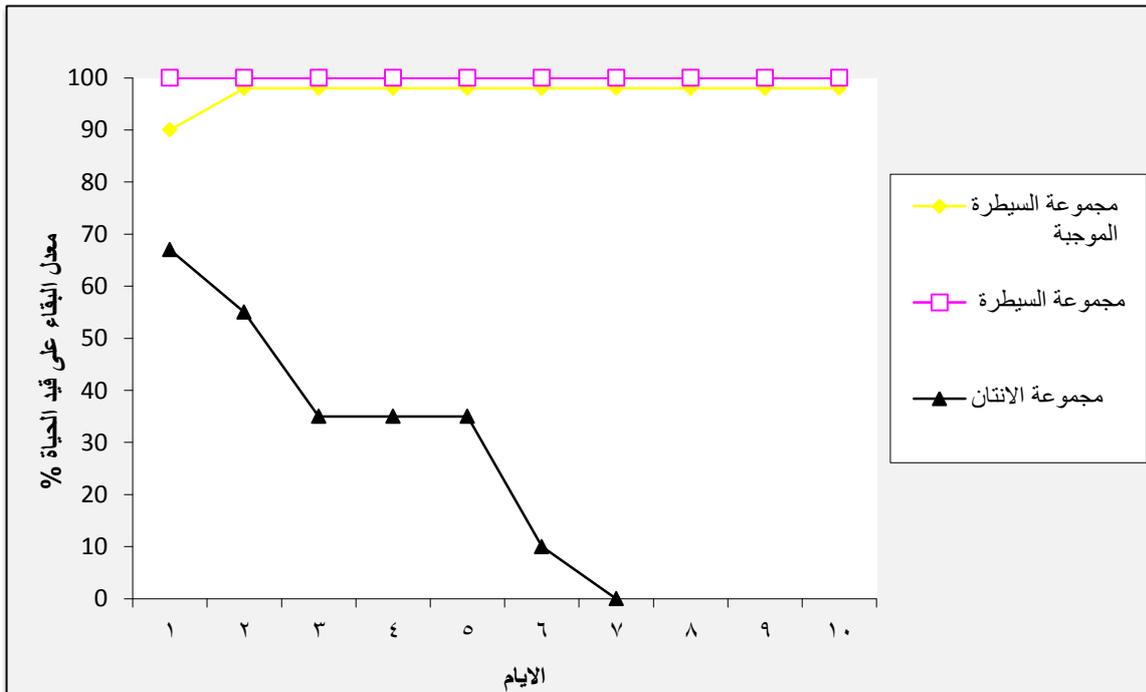
شكل (14) : مزرعة خلايا نقي عظم جرد بعد مرور 14 يوم من الزرع الاولي ، توضح تكون طبقة محتشدة من الخلايا الجذعية (400x)

## 2-4 المحور لثاني :

إحداث الأذى في بعض أعضاء وانسجة الجسم باستخدام الخمج متعدد الجراثيم  
**polymicrobial infection** والمحدث تجريبياً عن طريق عملية ربط الاعور وثقبه **Cecal**  
**ligation and Puncture**.

1-2-4 معدل البقاء على قيد الحياة **Survival Rate**

أظهر معدل البقاء على قيد الحياة انخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة للجرذان إلى (65%) بعد 24 ساعة من عملية إحداث الإنتان بطريقة ربط الاعور وثقبه واستمر الانخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة ليصل إلى (0%) بعد 7 أيام من إحداث الإنتان . وبالنسبة إلى جرذان مجموعة السيطرة الموجبة (Sham-group) وبعد 24 ساعة من اجراء العملية الجراحية فلو حظ انخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة إذ وصل إلى (90%) بعدها لم يحدث أي حالة نفوق في الجرذان طول مدة التجربة وكذلك في مجموعة السيطرة السالبة إذ لم يسجل أي حالة نفوق لجرذان هذه المجموعة الشكل (15).



شكل رقم (15) : معدل البقاء على قيد الحياة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة السيطرة الموجبة sham ومجموعة الانتان المحدث تجريبياً.

#### 2-2-4 Clinical signs العلامات السريرية

أظهرت الجرذان التي احدث بها الإنتان بعد 24 ساعة علامات سريرية تمثلت بالخمول والكسل وعدم الاستجابة للمؤثرات الخارجية فضلاً عن علامات الالم وزيادة في معدلات التنفس والنفوق . أما بعد 3 و 7 أيام من الإنتان المحدث تجريبياً فلوحظ نفوش في الشعر وتجمع الحيوانات حول بعضها وقلة الحركة مع انخفاض شديد في استهلاك العلف مع خمول الشديد وانخفاض في معدلات التنفس ثم النفوق.

أما مجموعة السيطرة فلم تسجل أي علامات سريرية عليها خلال مدة التجربة ، في حين لوحظ على حيوانات السيطرة الموجبة Sham علامات سريرية ما بعد العملية الجراحية تضمنت الخمول وقلة الحركة والاكل بعدها رجعت الى حالتها الطبيعية .

#### 3-2-4 Gross pathological changing التغيرات المرضية العيانية

لوحظ في الجرذان التي تم إحداث الإنتان بها عن طريق ربط الاعور وثقبه وبعد 24 ساعة احتقان ونزف شديد في الاعضاء الداخلية مع انتفاخ في المعدة والامعاء الدقيقة والغليظة مع وجود بقع نخرية منتشرة على سطح الكبد (الشكل 16 و 17) ، اما بعد 3 ايام فلوحظ احتقان وتوسع للاوعية الدموية في غشاء الخلب ، إرتشاح لسوائل مصلية في التجويف البطني ، الامعاء الدقيقة ظهرت محتقنة ومتوسعة ، احتقان شديد في الطحال ووجود بقع نزفية على الرئة ، الكبد محتقن ومتضخم مع وجود مناطق نخرية على سطحه (الشكل 18 A) مقارنة مع مجموعة السيطرة (الشكل 18 B) .

اما بعد 7 ايام فكانت الافات اكثر شدة تضمنت احتقانات شديدة لغشاء الخلب ووجود انزفة حبرية تحت محفظة الكبد كما ولوحظ احتقان شديد وانزفة في القلب والرئتين ، مع حدوث حالات التصاق ليفينية شديدة للامعاء .

أما بالنسبة لجرذان مجموعة السيطرة الموجبة Sham فلوحظ وجود احتقانات في الاوعية الدموية المسارية وفي غشاء الخلب.

#### 4-2-4 Histopathological changes التغيرات المرضية النسجية

أوضح الفحص النسجي المجهرى في جرذان مجموعة السيطرة الموجبة Sham group التركيب السوي للرئة المتكون من الاسناخ الرئوية والقصيبات الرئوية ولم تظهر أي تغيرات مرضية عليها سوى ارتشاح طفيف للخلايا الالتهابية مع وجود نزف حول القصيبات الهوائية وبين الاسناخ الرئوية ، مع ملاحظة ظاهرة النفاخ (الشكل 19) ، وفي الكبد أوضح الفحص النسجي المجهرى

وجود تغيرات طفيفة في الخلايا الكبدية تمثلت بالتنكس الفجوي والنخر لبعض الخلايا الكبدية مع توسع الاوردة المركزية والجيبانيات (الشكل 20 A) مقارنة مع مجموعة السيطرة (الشكل 20 B). أما في مقاطع الكلية فلوحظ وجود تغيرات نسجية تمثلت بانتفاخ وتخر الخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية ، فضلاً عن إرتشاح بسيط للخلايا الالتهابية ، مقارنة مع مجموعة السيطرة (الشكل 21). أما في المقاطع النسجية للقلب فلم يلاحظ وجود تغيرات مرضية سوى احتقان للأوعية الدموية مع وجود الوذمة بين الالياف العضلية القلبية .

**أما في جرذان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً عن طريق ربط الاعور وثقبه :**  
الكبد : اظهر الفحص النسجي المجهرى بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان تجريبياً وجود احتقان في الاوردة المركزية ، مع ملاحظة تفجى Vacuolation وتورم الخلايا الكبدية الحاد Acute cell swelling فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية في مركز الفصيصة Centrilobular necrosis . كما ولوحظ في مقاطع اخرى وجود تكلف للخلايا الالتهابية اللمفية والعدلات حول الاوردة المركزية، وظهرت مقاطع نسجية اخرى إرتشاح الخلايا الالتهابية في الباحة البابية مع توسع واحتقان للأوردة المركزية (الشكل 22).

بعد 3 أيام من إحداث حالة الإنتان ، لوحظ وجود تغيرات نسجية اكثر شدة تمثلت بالنخر الشديد للخلايا الكبدية مع احتقان للأوردة المركزية ، فضلاً عن إرتشاح للخلايا الالتهابية في الباحة البابية ، كما اظهرت مقاطع نسجية اخرى وجود ظاهرة الموت الخلوي المبرمج لبعض الخلايا الكبدية فضلاً عن النزف بين الخلايا الكبدية (الشكل 23 و 24) .

وبعد 7 أيام من إحداث الإنتان تجريبياً عن طريق ربط الاعور وثقبه كانت الآفات المرضية النسجية اكثر شدة تمثلت بالنخر الشديد للخلايا الكبدية حول الاوردة المركزية مع الخثرات حديثة التكوين Recent thrombus ملتصقة بجدار الوريد المركزي (الشكل 25 و 26).

**الرئة :** أوضح الفحص النسجي المجهرى لمقاطع الرئة في الجرذان المحدث بها الإنتان تجريبياً بعد 24 ساعة وجود النزف بين الاسناخ الرئوية مع إرتشاح الخلايا الالتهابية حول الاوعية الدموية فضلاً عن الاحتقان الشديد للاوعية الدموية بين الاسناخ الرئوية ، مع وضوح ظاهرة النفاخ الرئوي (الشكل 27) . أما بعد 3 أيام من إحداث الإنتان فلوحظ وجود حالة ذات الرئة الخلالي Interstitial pneumonia التي تميزت بإرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المتمثلة بالخلايا اللمفية والعدلات بين الاسناخ الرئوية التي سببت تثخن شديد في جدران الاسناخ الرئوية ، كما لوحظ في مقاطع نسجية اخرى نخر وتوسف للخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية مع التثخن الواضح لجدار الاوعية الدموية (الشكل 28 و 29).

بعد 7 أيام من إحداث حالة الإنتان ، لوحظ وجود آفات مرضية متقدمة وأكثر شدة تمثلت تحطم شديد للاسناخ الرئوية مع إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية اللمفية ووحيدة النواة في النسيج الخلالي وحول القصيبات الرئوية التي كانت تعاني من فرط تنسج للخلايا الظهارية المبطنة لها ، فضلاً عن توسف في الخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية مع التخن الشديد في جدران الاوعية الدموية . كما لوحظ ايضاً وجود خثرة دموية حديثة التكوين داخل الاوعية الدموية (الشكل 30 و 31) .

**الكلية :** اوضح الفحص النسجي المجهرى لكلى حيوانات هذه المجموعة بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان وجود تغيرات نسجية تمثلت بوضوح النزف الشديد بين النبيبات الكلوية وفي النسيج الخلالي ، فضلاً عن تضيق في تجاويف بعض النبيبات الكلوية نتيجة للتورم الحاد للخلايا الظهارية المبطنة لها ، فيما أظهرت مقاطع اخرى النخر التجلطي للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات (الشكل 32) . كما لوحظ توسع في تجاويف بعض النبيبات الكلوية مع النزف الشديد بين هذه النبيبات الكلوية (الشكل 33) .

بعد 3 ايام من إحداث الإنتان لوحظ الإرتشاح البؤري للخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات والخلايا البلعمية واللمفية ، أما التغيرات النسجية للكبيبات الكلوية فتمثلت بإتساع في حيز بومان الناجم عن انكماش اللمة الكبيبية ، في حين ظهرت كبيبات اخرى تعاني من تحطم للغشاء القاعدي ووضوح النزف فيها . أما التغيرات الوعائية فظهرت على شكل احتقانات شديدة للاوعية الدموية مع وضوح التخن في جدرانها (الشكل 34 و 35) .

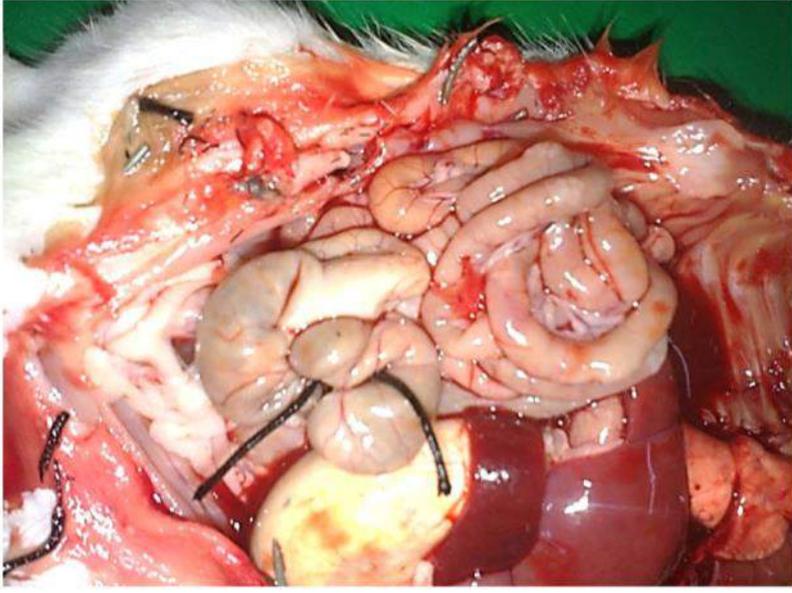
في حين بعد 7 أيام من إحداث الإنتان ، كانت الآفات اكثر شدة متمثلة بالنخر الشديد للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية مع إرتشاح طفيف للخلايا الالتهابية حول الكبيبات وفي النسيج الخلالي ، في حين اظهرت مقاطع اخرى وجود الخثرة في الاوعية الدموية (الشكل 36).

**القلب :** اظهر الفحص النسجي المجهرى لعضلة القلب في جردان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً وبعد 24 ساعة وجود تنكس وتخر في الخلايا العضلية القلبية Cardiomyocytes مع ملاحظة للوذمة بين الالياف العضلية القلبية فضلاً عن إرتشاح البؤري للخلايا الالتهابية (الشكل 37) .

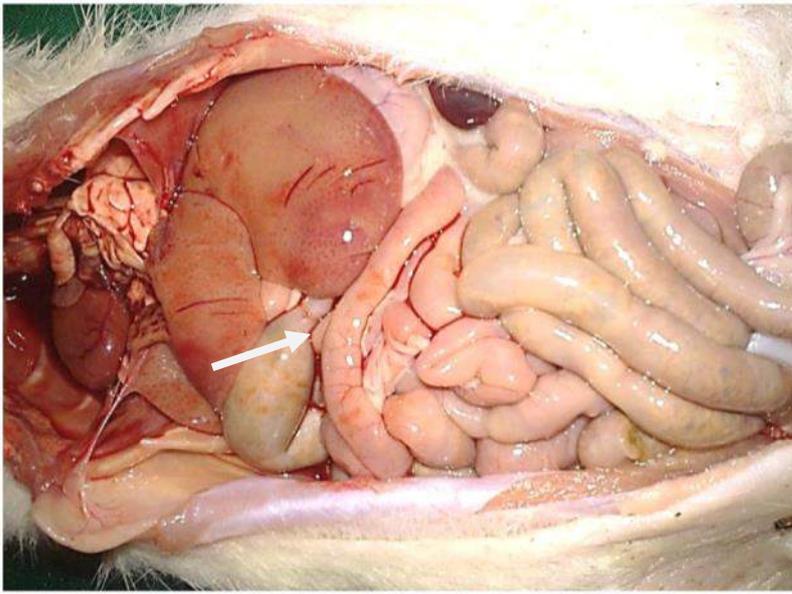
وبعد 3 أيام من إحداث الإنتان كانت الافات المرضية النسجية اكثر شدة تمثلت بالنخر الشديد في خلايا العضلة القلبية Zenker's Necrosis of myocardium ، فضلاً عن الوذمة بين الالياف العضلية القلبية (الشكل 38) .

بعد 7 أيام لوحظ نخر شديد للخلايا العضلية القلبية مع ملاحظة تتخن في جدران الاوعية الدموية فضلاً عن ظهور الخثرة الدموية في بعض الاوعية الدموية (الشكل 39).

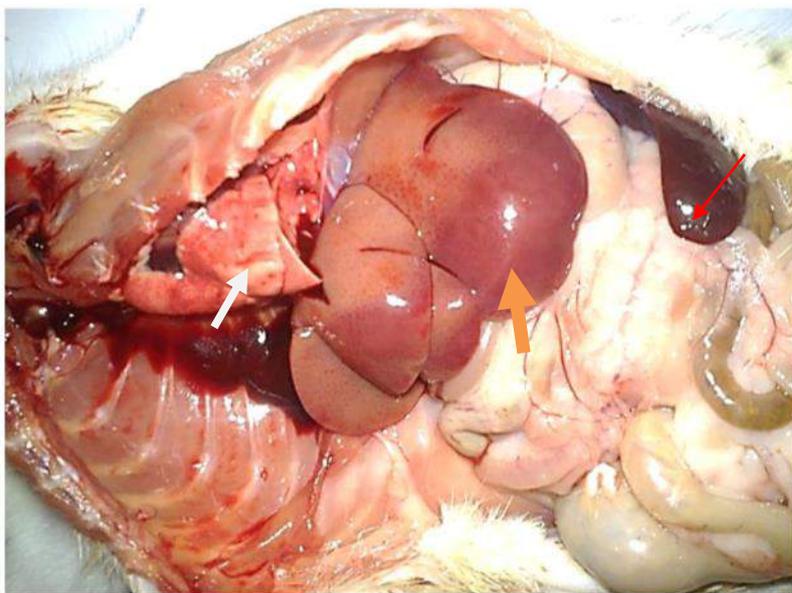
**الامعاء :** أظهرت المقاطع النسجية لأمعاء الجرذان التي احدث بها الإنتان تجريبياً وبعد 24 ساعة إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية اللمفية والعدلات في الطبقات المخاطية وتحت المخاطية ، فضلاً عن تنكس مخاطيني Mucinous degeneration في الخلايا المبطنة للزغابات والغدد المعوية مع وجود العديد من الخلايا الكأسية فضلاً عن التتخن الواضح في سمك الطبقة العضلية (الشكل 40 و 41) . اما وبعد 3 و 7 أيام من إحداث الإنتان كانت الآفات اكثر شدة تمثلت بالنخر الشديد والتوسف للظهارة المبطنة للزغابات المعوية ، مع احتقان و تتخن في جدار الاوعية الدموية مع نخر في الخلايا العضلية المكونة للطبقة العضلية (الشكل 42 و 43) .



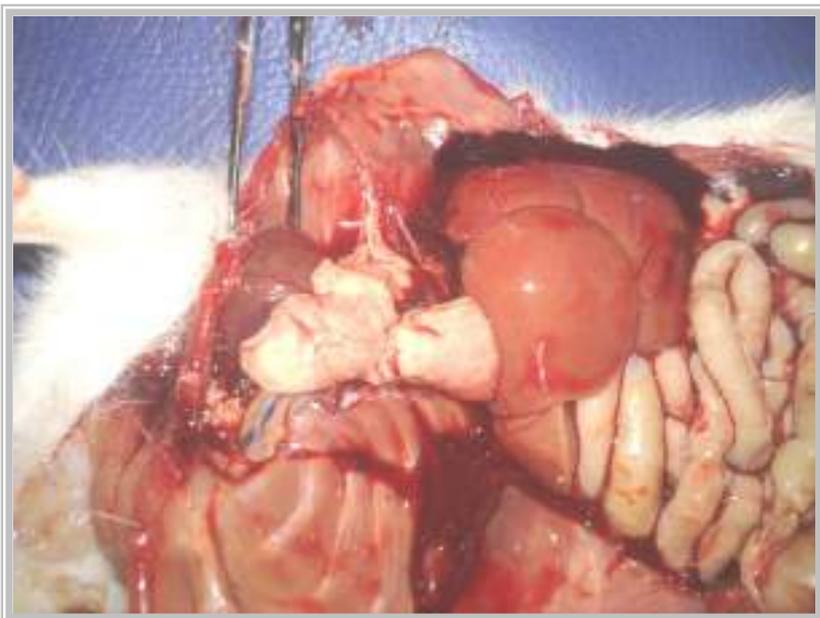
شكل (16) : مقطع عياني لجرز بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح احتقان ونزف في الاعضاء المختلفة ، مع انتقال للمعدة



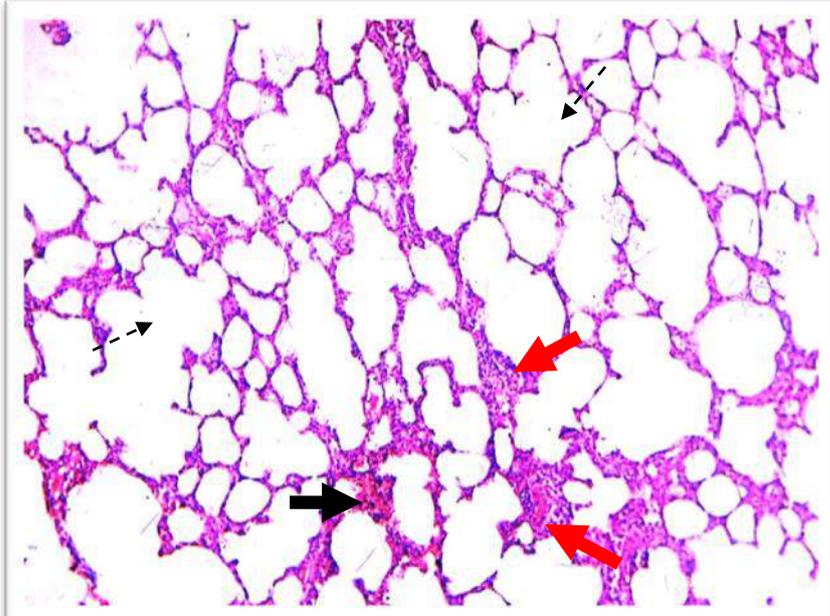
شكل (17) : مقطع عياني لجرز بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح وجود بقع نخرية على الكبد



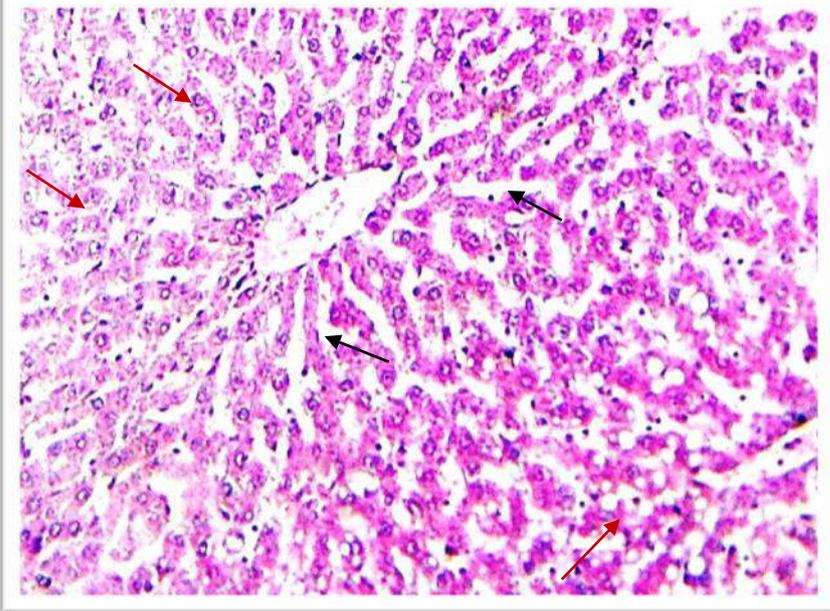
شكل (A18) : مقطع عياني لجرز بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح احتقان الطحال ، وجود بقع نزفية على الرئة مع تضخم الكبد ووجود مناطق نخرية على سطحه ، فضلاً عن وجود التصاقات ليفينية على المعدة والأمعاء



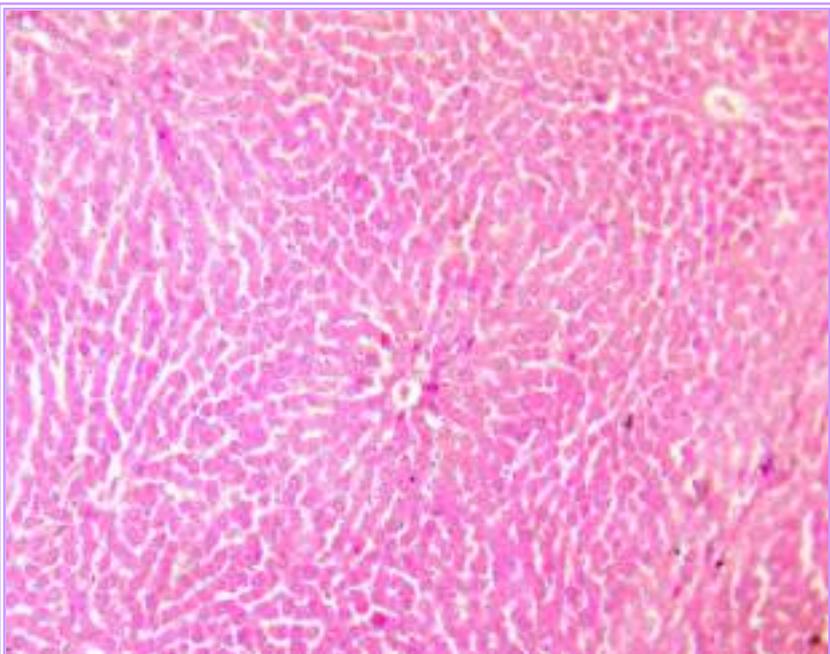
شكل (B18) : مقطع عياني لجرذ من مجموعة السيطرة ، يوضح عدم وجود تغيرات مرضيه على كل من الرئة و الكبد ، فضلاً عن المعدة والامعاء



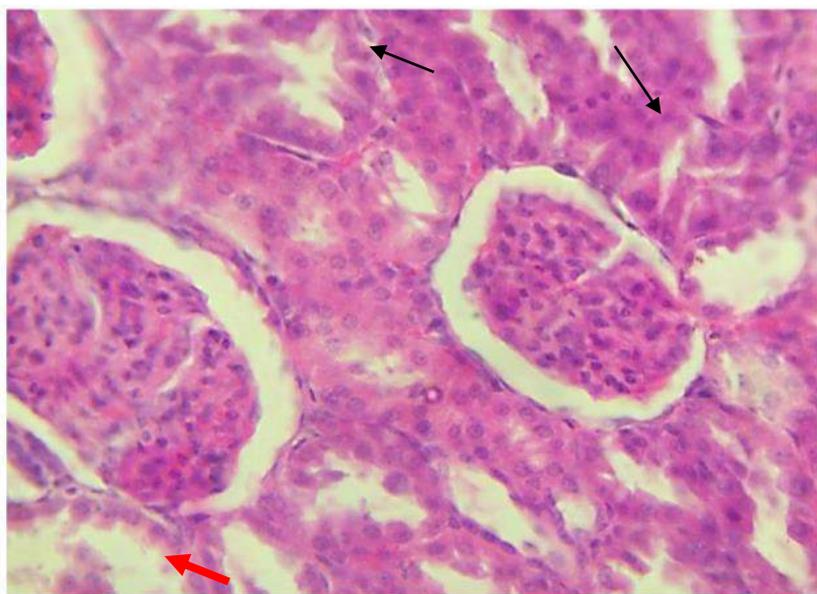
شكل (19) : مقطع نسجي لرئة جرد من مجموعة السيطرة sham وبعد 3 أيام ، يظهر فيه النزف بين الاسناخ الرئوية (➔) مع ارتشاح طفيف للخلايا الالتهابية (➔) فضلاً عن النفاخ (↗) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 42



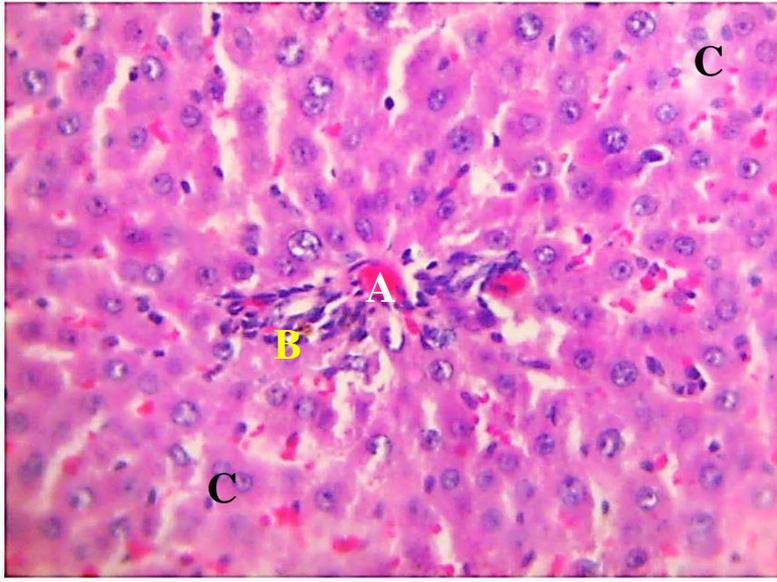
شكل (20 A) : مقطع نسجي لكبد جرد من مجموعة السيطرة sham وبعد 3 أيام ، يظهر توسع الجيبانيات (↘) مع تفجي ونخر الخلايا الكبدية (➔) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 105



شكل (20 B) : مقطع نسجي لكبد جرد من مجموعة السيطرة ، يظهر الشكل الطبيعي لنسيج الكبد.  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين .  
42 x

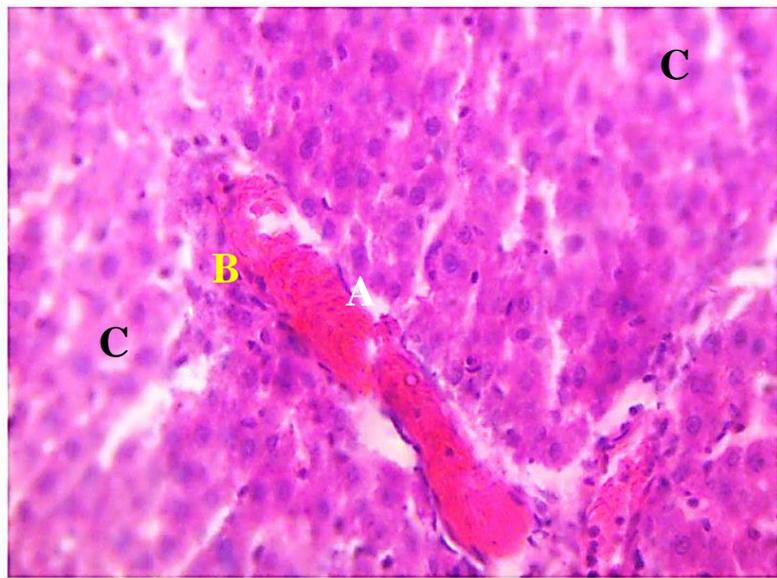


شكل (21) : مقطع نسجي لكلية جرد من مجموعة السيطرة sham وبعد 3 أيام، يظهر تورم الخلايا الظهارية المبطنة للنيبيات الكلوية (←) وتتخر البعض الآخر منها (→).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



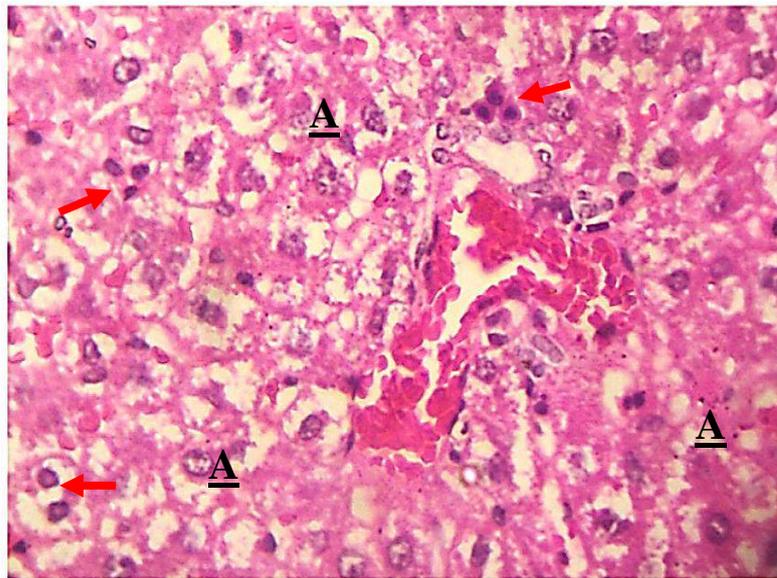
شكل (22) : مقطع نسجي لكبد جزء بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح احتقان الوريد المركزي (A) مع تكفف للخلايا الالتهابية حوله (B) ، فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية (C).

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 105



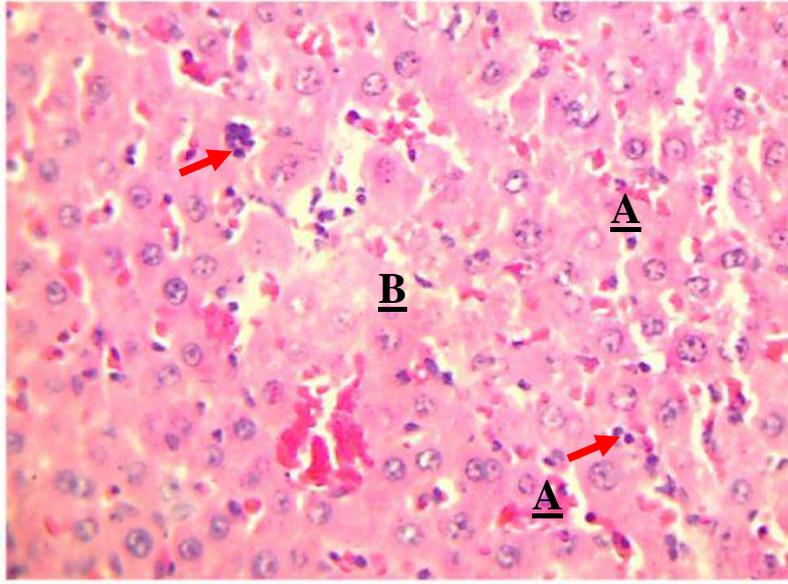
شكل (23) : مقطع نسجي لكبد جزء بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح احتقان شديد للاوعية الدموية في الباحة البابية (A) ، مع تكفف للخلايا الالتهابية (B) ، والنخر التجلطي الشديد للخلايا الكبدية (C).

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 105

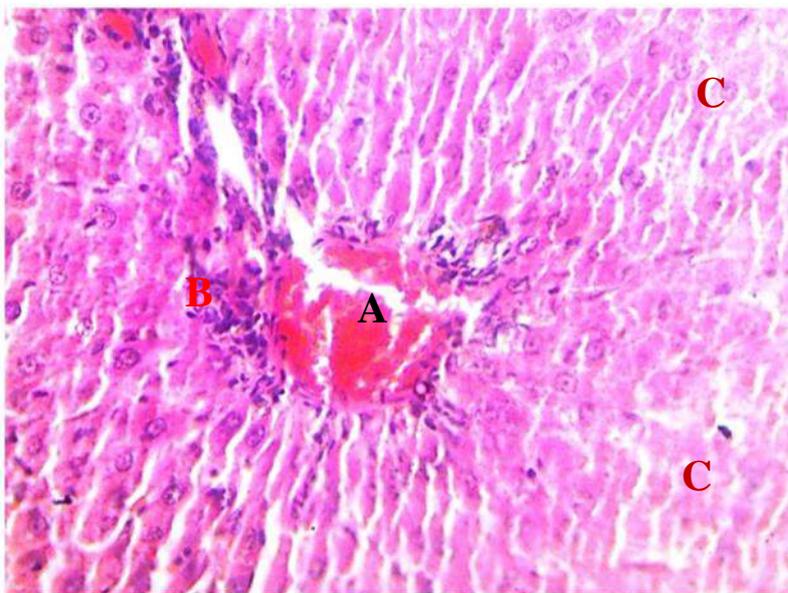


شكل (24) : مقطع نسجي لكبد جزء بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح النخر الشديد في الخلايا الكبدية (A) ، مع وضوح ظاهرة الموت المبرمج للخلايا الكبدية (B).

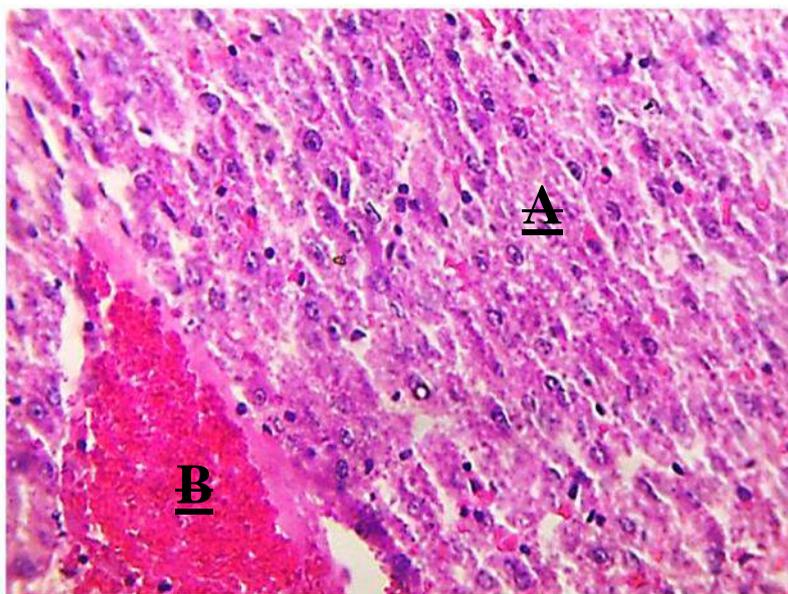
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 105



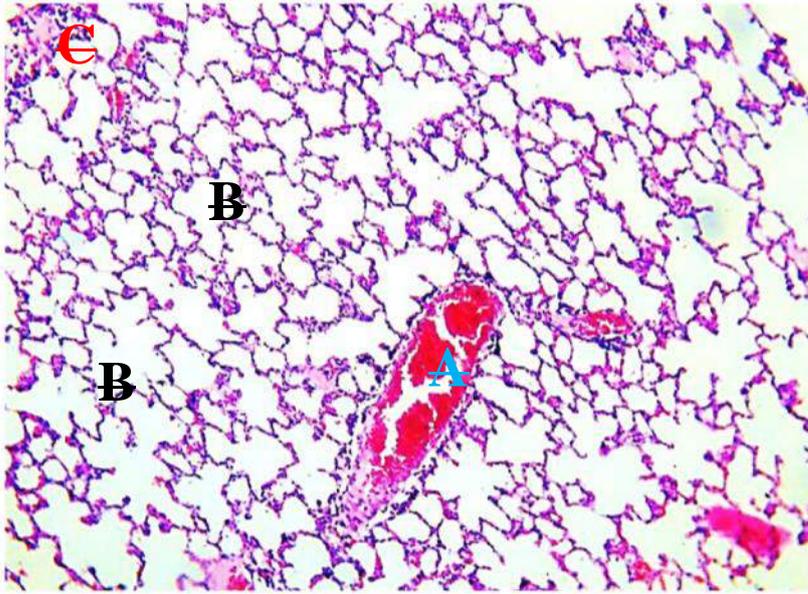
شكل (25) : مقطع نسجي لكبد جزء بعد 3 أيام من أحداث الانتان ، يوضح النزف بين الخلايا الكبدية (A) ، مع وضوح ظاهرة الموت المبرمج للخلايا الكبدية (B) مع النخر الشديد .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



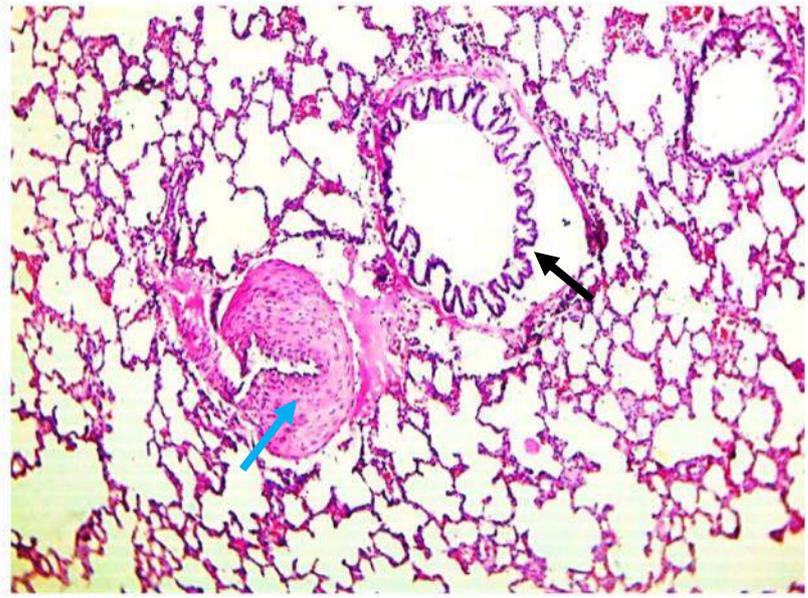
شكل (26) : مقطع نسجي لكبد جزء بعد 3 أيام من أحداث الانتان ، يوضح احتقان الاوعية الدموية في الباحة البابية (A) مع ارتشاح للخلايا الالتهابية (B) فضلا عن النخر الشديد للخلايا الكبدية (C).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



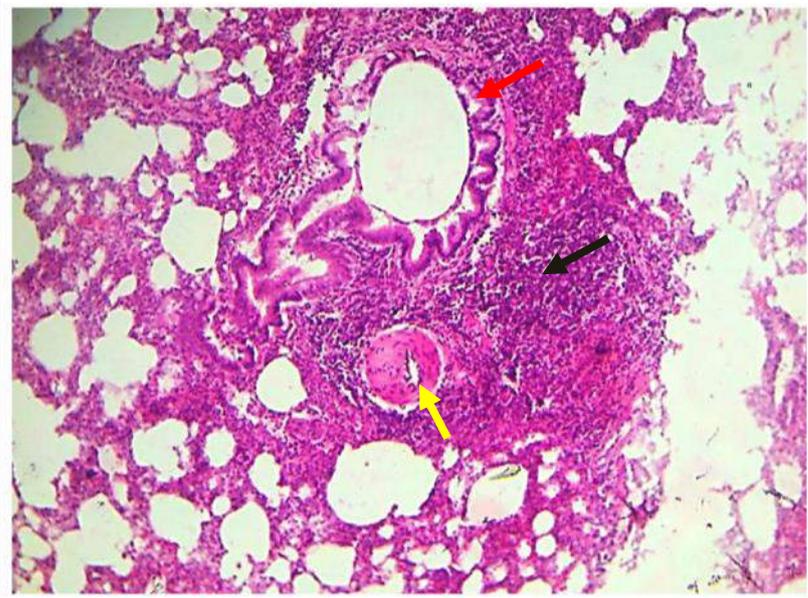
شكل (27) : مقطع نسجي لكبد جزء بعد 7 أيام من أحداث الانتان ، يوضح النخر الشديد للخلايا الكبدية (A) مع وجود الخثرة الدموية (B) ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



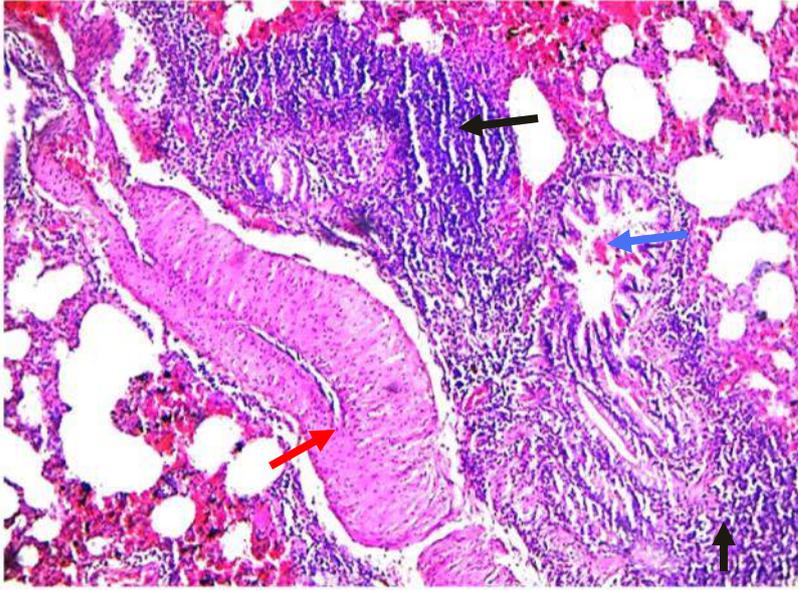
شكل (28) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح احتقانات للاوعية الدموية (A) ، مع وضوح ظاهرة النفاخ الرئوي (B) فضلاً عن ارتشاح للخلايا الالتهابية (C).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x



شكل (29) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح وجود نخر وتوسف لظاهرة القصيبات الهوائية ( ) مع ملاحظة التثخن في جدار الوعاء الدموي ( ).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x

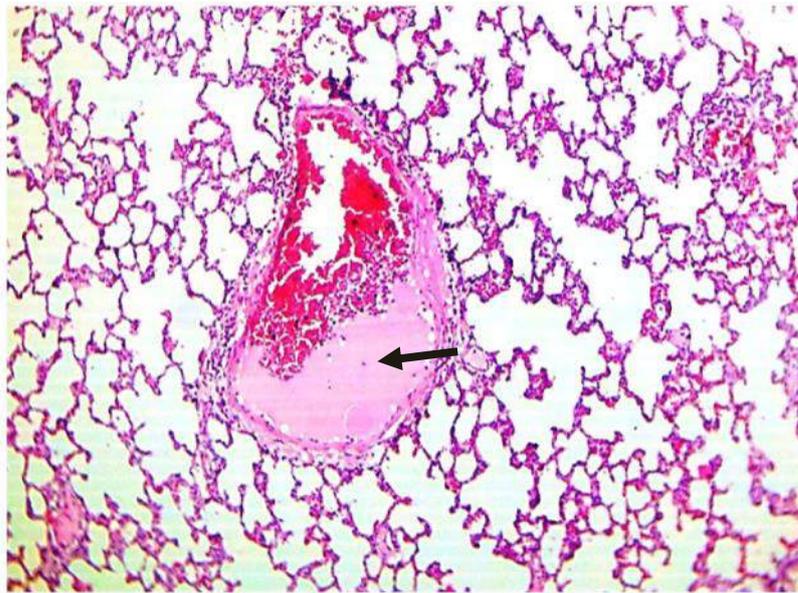


شكل (30) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح تثخن لجدار الاسناخ الرئوية بسبب ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية ( ) مع التثخن الشديد لجدار الوعاء الدموي ( ) فضلاً عن فرط تنسج لظاهرة القصيبات الهوائية ( ).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x



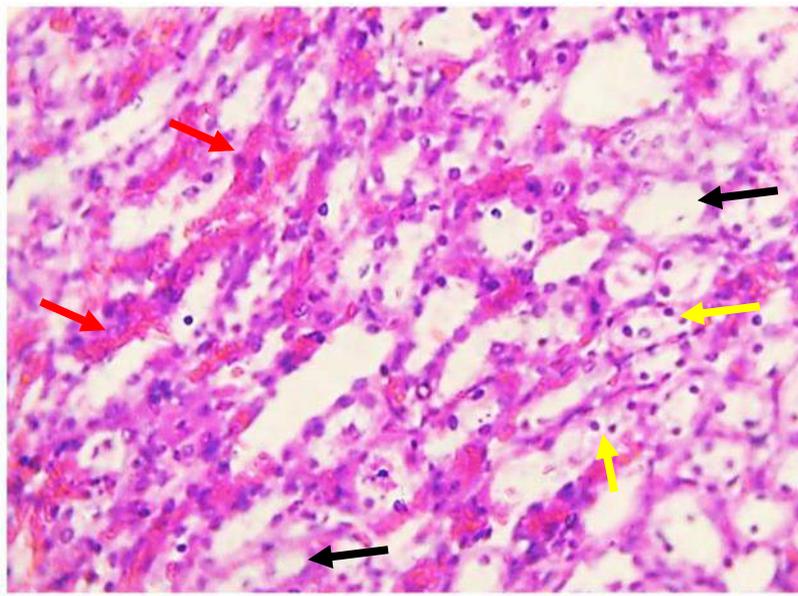
شكل (31) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد 7 أيام من احداث الانتان ، يوضح وجود ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية حول القصبية الهوائية وحول الاوعية الدموية (↗) مع وجود تتخن شدد لجدار الوعاء الدموي (↘) فضلاً عن النخر والتوسف للخلايا الظهارية المبطنة للقصبية الهوائية (↙).

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



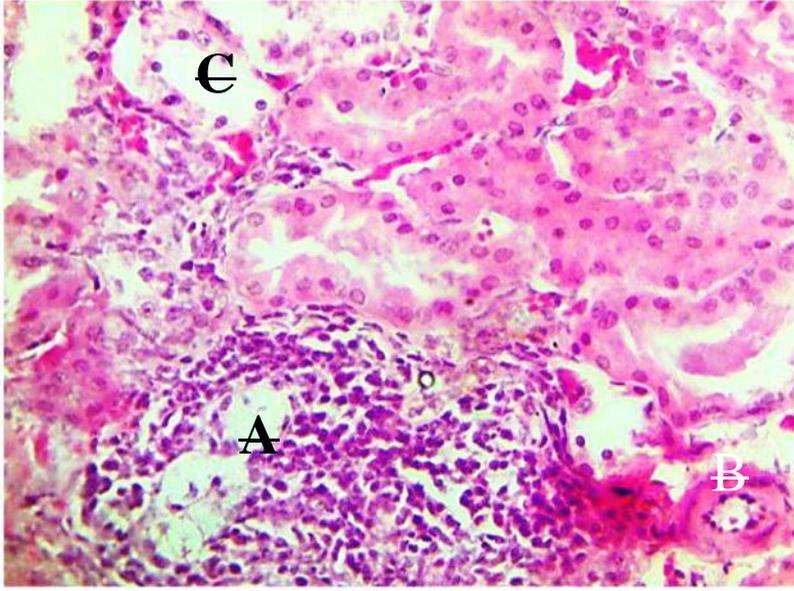
شكل (32) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد 7 أيام من احداث الانتان ، يوضح وجود خثرة دموية داخل الوعاء الدموي .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x

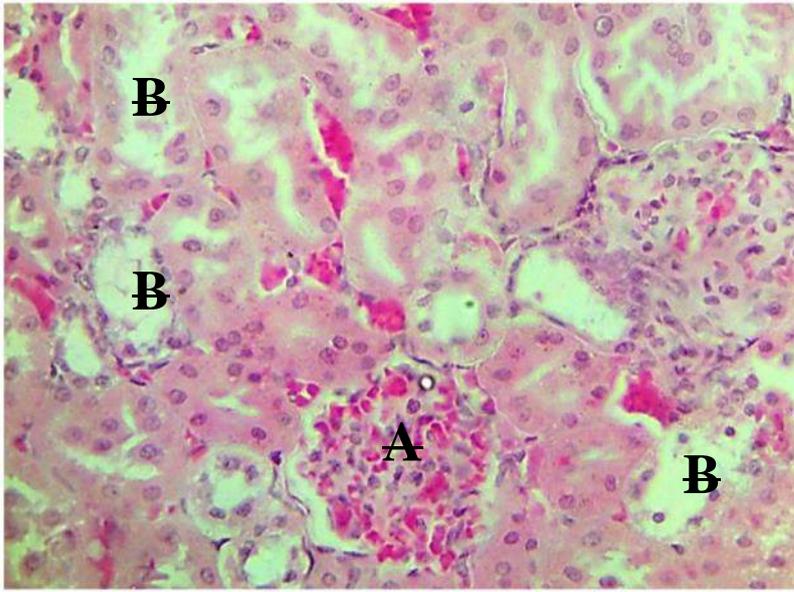


شكل (33) : مقطع نسجي لكلىة جرد بعد ساعة 24 من احداث الانتان ، يوضح وجود النخر للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية (↖) وكذلك وضوح ظاهرة الموت المبرمج (↗) فضلاً عن النزف (↘).

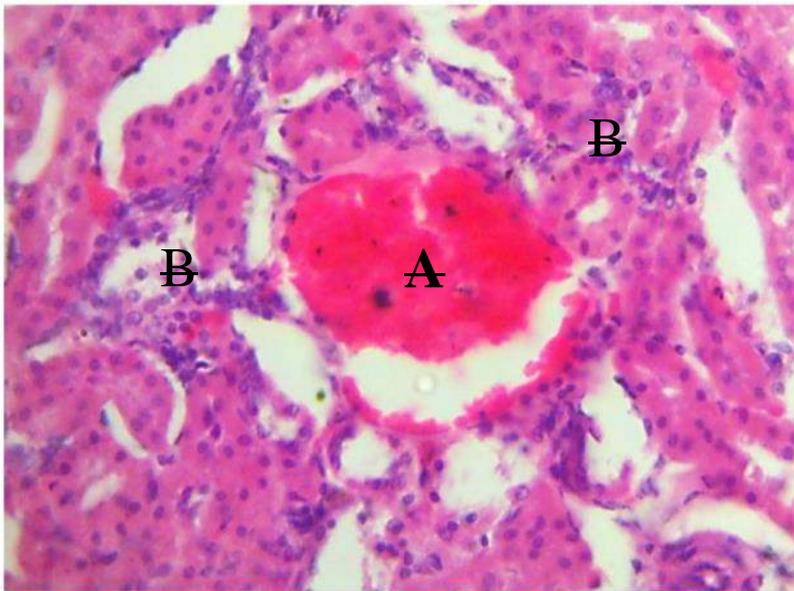
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



شكل (34) : مقطع نسجي لكلىة جرد بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح وجود ارتشاح بؤري للخلايا الالتهابية (A) مع ملاحظة وجود تثخن في جدار الوعاء الدموي (B) ، فضلا عن النخر في الخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات (C).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



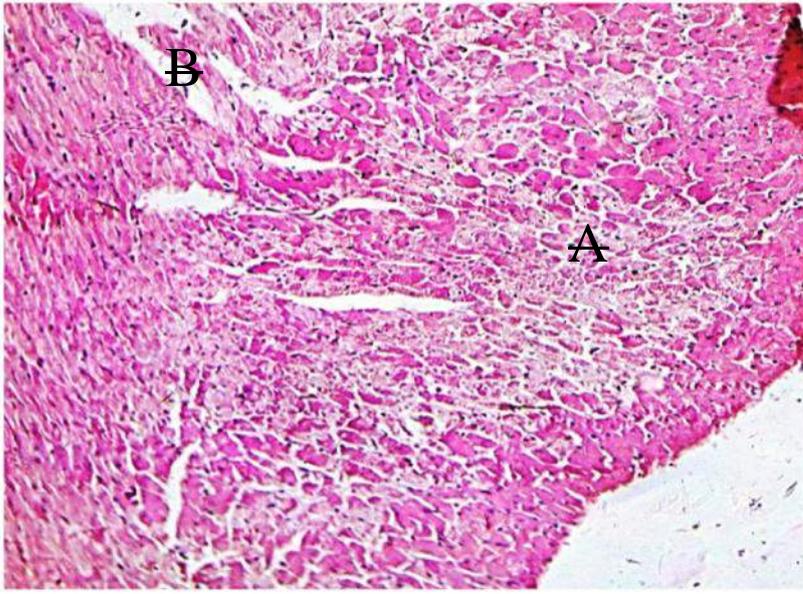
شكل (35) : مقطع نسجي لكلىة جرد بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح وجود نخر ونزف في الكبيبة الكلوية (A) مع ملاحظة النخر الشديد للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية (B).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



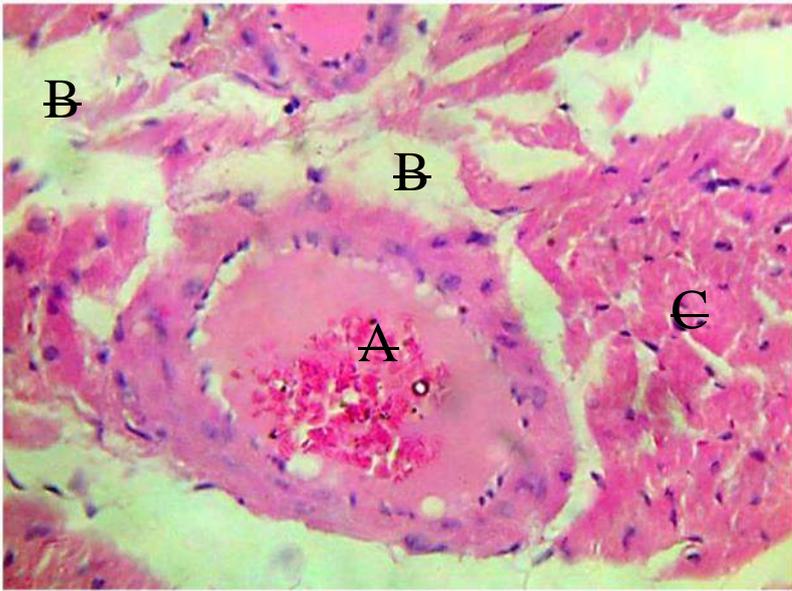
شكل (36) : مقطع نسجي لكلىة جرد بعد 7 أيام من احداث الانتان ، يوضح وجود الخثرة الدموية داخل الوعاء الدموي (A) مع ارتشاحات للخلايا الالتهابية (B).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



شكل (37) : مقطع نسجي لقلب جرد بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية (A) ، ومع وجود نخر في الخلايا العضلية القلبية (B) فضلاً عن الوذمة بين الالياف العضلية (C) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x



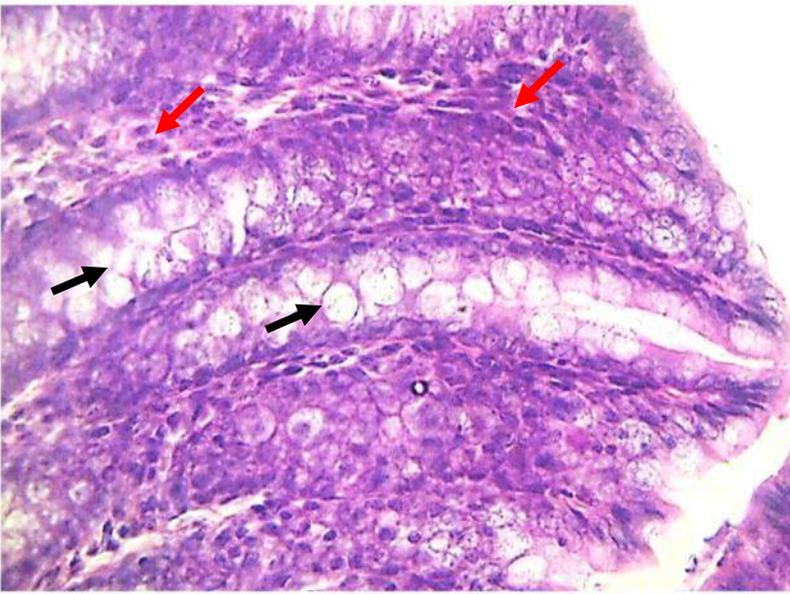
شكل (38) : مقطع نسجي لقلب جرد بعد 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح النخر الشديد في عضلة القلب (A) مع وجود الوذمة بين الالياف العضلية القلبية (B) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x



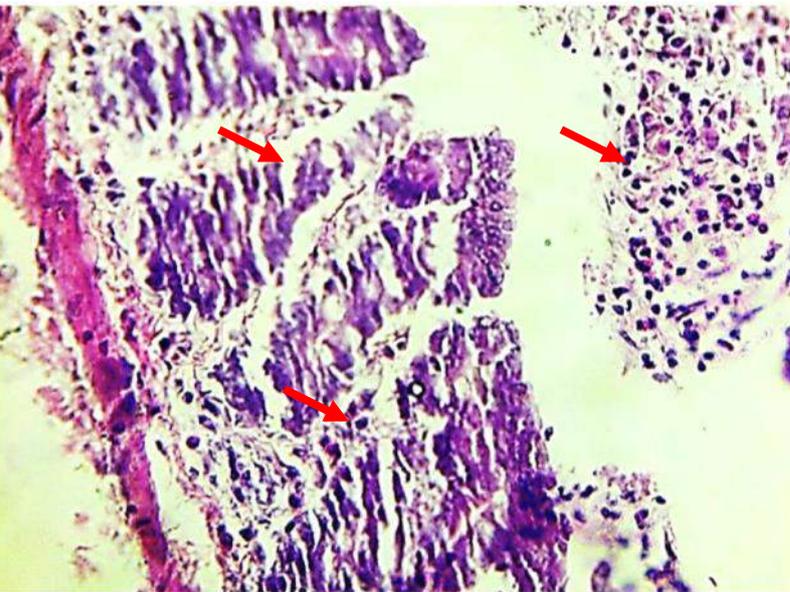
شكل (39) : مقطع نسجي لقلب جرد بعد 7 أيام من احداث الانتان ، يوضح النخر الشديد للخلايا العضلية القلبية (A) مع الوذمة (B) فضلاً عن وجود تئخن في جدار الوعاء الدموية ووجود الخثرة الدموية (C) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



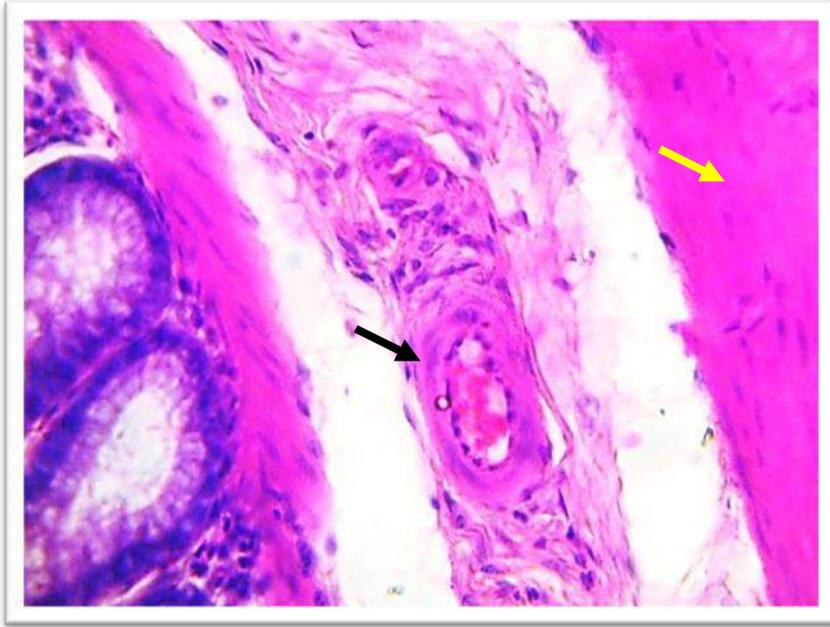
شكل (40) : مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح الارتشاح الكثيف للخلايا الالتهابية في الطبقة المخاطية وتحت المخاطية (→) مع وجود تتخن في الطبقة العضلية (↗).  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



شكل (41) : مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح وجود تنكس مخاطيني للخلايا المبطنة للزغابات والغدد المعوية (↗) مع ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية (↘) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



شكل (42) : : مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 7 أيام من احداث الانتان ، يوضح النخر الشديد مع التوسف للخلايا الظهارية المبطنة للزغابات المعوية .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



شكل (43) : مقطع نسجي لأمعاء جرد بعد 7 أيام من أحداث الانتان ، يوضح احتقان مع تثخن في جدار الوعاء الدموي (▲) مع وجود نخر في الطبقة العضلية (▲) .

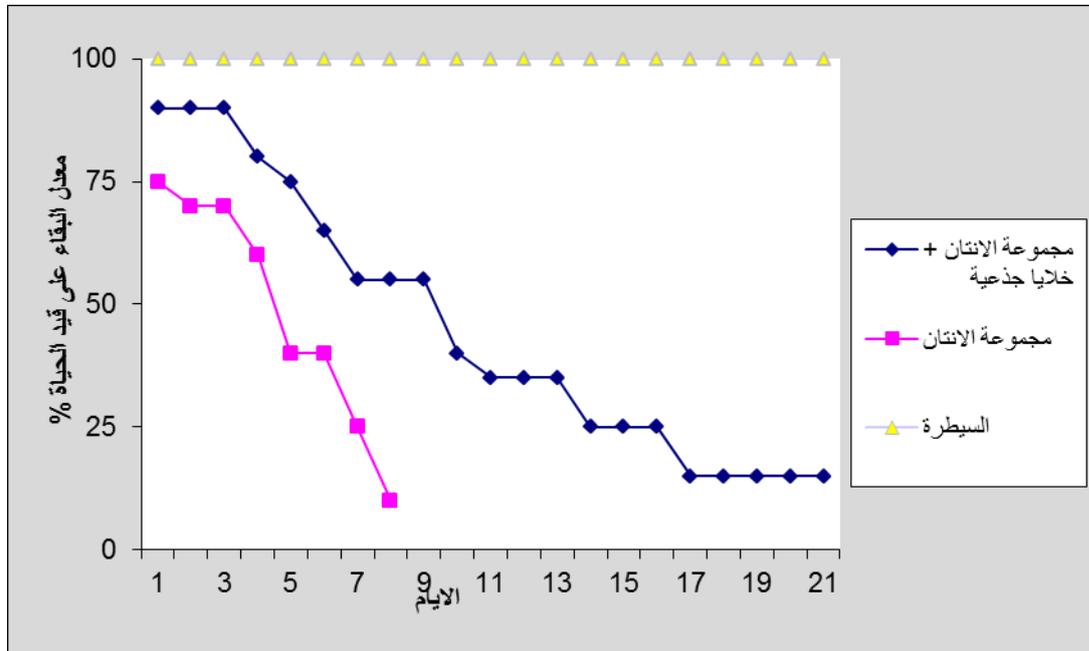
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x

## 3-4 المحور الثالث :

دراسة تأثير حقن الخلايا الجذعية اللحمية في الحد من أو تقليل الآفات  
المرضية الناجمة عن الإنتان

## 1-3-4 معدل البقاء على قيد الحياة Survival Rate

أظهرت نسب معدلات البقاء على قيد الحياة في التجربة التي تم حقن الجرذان بالخلايا الجذعية بعد إحداث الإنتان فيها بقاء الحيوانات في هذه التجربة إلى اليوم 21 بعد إحداث حالة الإنتان ، وكانت نسبة البقاء على قيد الحياة خلال 24 ساعة من الإنتان 90% واستمرت هذه النسبة بدون انخفاض وعدم حدوث نفوق إلى اليوم الثالث . في حين كانت نسبة البقاء على قيد الحياة في جرذان مجموعة الإنتان 75% بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان فيها واستمرت بالانخفاض إلى اليوم الثامن من التجربة لتصل إلى 0% . ولم تسجل أي حالة نفوق في مجموعة السيطرة خلال مدة التجربة الشكل (44).



شكل رقم (44) : معدل البقاء على قيد الحياة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة الانتنان المحدث تجريبياً ، ومجموعة الانتنان المحقونة بالخلايا الجذعية

### 4-3-2 التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي C – reactive protein

يوضح الجدول رقم (1) التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي سي في جرذان مجاميع هذا المحور وبعد 24 ساعة من إحداث الإنتان ، إذ لوحظ عدم وجود أي فروقات معنوية في نسب الخلايا اللمفية ، وفي تركيز خضاب الدم بين المجاميع المختلفة . في حين لوحظ وجود فرق معنوي في العدد الكلي لكريات الدم البيض لجرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية عند مقارنتها مع جرذان مجموعة الإنتان ، كذلك لوحظ وجود انخفاض معنوي لنسب الخلايا وحيدة النواة في جرذان مجموعة الإنتان والمحقونة بالخلايا الجذعية مقارنة مع مجموعة الإنتان ، كما ولوحظ وجود انخفاض معنوي في العدد الكلي لكريات الدم الحمر في مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية مقارنة مع المجاميع المختلفة ، وتم ملاحظة وجود تحسن وفرق معنوي في العدد الكلي للصفائح الدموية في جرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية عند مقارنتها مع مجموعة الإنتان .

أما بالنسبة لمستوى البروتين التفاعلي سي ، فلوحظ وجود انخفاض معنوي في مستوى هذا البروتين في جرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية عند مقارنتها مع مجموعة الإنتان ، ولكن هذا الانخفاض لم يصل إلى مستوى المعنوية عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة.

ويوضح الجدول رقم (2) التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي سي بعد 3 أيام من إحداث الإنتان ، لوحظ عدم وجود فروقات معنوية في نسب الخلايا وحيدة النواة وفي تركيز خضاب الدم بين المجاميع المختلفة . في حين لوحظ وجود ارتفاع معنوي في العدد الكلي لكريات الدم البيض وكذلك في نسب الخلايا اللمفية في جرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية مقارنة مع مجموعة الإنتان ، كما لوحظ وجود انخفاض معنوي في نسب الخلايا الحبيبية Granulocytes في جرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية مقارنة مع مجموعة الإنتان ولكن هذا الانخفاض لم يصل إلى مستوى المعنوية عند مقارنته مع مجموعة السيطرة . كذلك لوحظ تحسن وفرق معنوي في العدد الكلي للصفائح الدموية في جرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية عند مقارنتها مع مجموعة الإنتان.

أما بالنسبة لمستوى البروتين التفاعلي سي ، فلوحظ وجود انخفاض معنوي في مستوى هذا البروتين عند جرذان مجموعة الإنتان المحقونة بالخلايا الجذعية مقارنة مع مجموعة الإنتان ولكن هذا الانخفاض لم يصل إلى مستوى المعنوية مقارنة مع مجموعة السيطرة .

جدول رقم (1) : التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي في جردان المجاميع المختلفة بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان التجريبي.

المجاميع المختلفة				
مجموعة الإنتان + الخلايا الجذعية	مجموعة الإنتان	مجموعة السيطرة الموجبة (sham)	مجموعة السيطرة	
0.52 ± 11.00 A	0.25 ± 5.71 C	0.46 ± 12.89 A	0.35 ± 10.63 A	العدد الكلي لكريات الدم البيضاء 10 <sup>9</sup> /L
4.62 ± 59.72 A	9.44 ± 47.92 B	6.20 ± 59.54 A	3.26 ± 65.35 A	نسبة الخلايا اللمفية %
1.43 ± 4.66 B	1.01 ± 7.96 A	1.23 ± 3.12 B	1.0 ± 4.24 B	نسبة الخلايا وحيدة النواة %
3.27 ± 35.68 B	1.71 ± 44.12 A	4.08 ± 37.38 B	3.12 ± 30.40 C	نسبة الخلايا الحبيبية %
0.33 ± 6.23 B	0.17 ± 7.90 A	0.54 ± 8.21 A	0.11 ± 7.28 A	العدد الكلي لكريات الدم الحمر
1.32 ± 13.62 A	0.26 ± 15.12 A	0.55 ± 13.70 A	0.16 ± 14.87 A	تركيز خضاب الدم g/dl
35.93 ± 762 A	51.96 ± 537 B	31.11 ± 766 A	22.63 ± 724 A	العدد الكلي للصفائح الدموية
0.48 ± 3.36 B	1.20 ± 7.20 A	0.0 ± 0.0 C	0.0 ± 0.0 C	مستوى البروتين التفاعلي سي ملغم / لتر

- القيم معبر عنها بالمعدل ± الخطأ القياسي

- الحروف المختلفة أفقياً تدل على وجود فرق معنوي والتفوق للحرف (A) يليه (B) وهكذا.

جدول رقم (2): التغيرات في صورة الدم ومستوى البروتين التفاعلي في جردان المجاميع المختلفة بعد 3 أيام من إحداث الإنتان التجريبي.

المجاميع المختلفة				
مجموعة الإنتان + الخلايا الجذعية	مجموعة الإنتان	مجموعة السيطرة الموجبة (sham)	مجموعة السيطرة	
0.40 ± 13.39 <b>A</b>	0.45 ± 5.78 <b>B</b>	0.52 ± 12.63 <b>A</b>	0.35 ± 10.68 <b>A</b>	العدد الكلي لكريات الدم البيضاء $10^9/L$
4.17 ± 60.56 <b>A</b>	2.37 ± 49.84 <b>C</b>	4.84 ± 65.60 <b>A</b>	3.26 ± 65.35 <b>A</b>	نسبة الخلايا اللمفية %
1.22 ± 3.42 <b>A</b>	1.27 ± 4.40 <b>A</b>	0.53 ± 4.40 <b>A</b>	1.0 ± 4.24 <b>A</b>	نسبة الخلايا وحيدة النواة %
4.53 ± 36.66 <b>AB</b>	8.25 ± 45.30 <b>A</b>	2.06 ± 31.66 <b>AB</b>	3.12 ± 30.40 <b>B</b>	نسبة الخلايا الحبيبية %
0.37 ± 6.88 <b>B</b>	0.61 ± 8.31 <b>A</b>	0.35 ± 6.94 <b>B</b>	0.11 ± 7.28 <b>AB</b>	العدد الكلي لكريات الدم الحمر
0.46 ± 13.70 <b>A</b>	2.18 ± 14.78 <b>A</b>	0.20 ± 12.20 <b>A</b>	0.16 ± 14.87 <b>A</b>	تركيز خضاب الدم g/dl
51.88 ± 839 <b>A</b>	79.18 ± 534 <b>B</b>	48.63 ± 846 <b>A</b>	22.9 ± 730 <b>A</b>	العدد الكلي للصفائح الدموية
2.44 ± 6 <b>B</b>	1.46 ± 9.60 <b>B</b>	0.0 ± 0.0 <b>A</b>	0.0 ± 0.0 <b>A</b>	مستوى البروتين التفاعلي سي ملغم / لتر

- القيم معبر عنها بالمعدل ± الخطأ القياسي

- الحروف المختلفة أفقياً تدل على وجود فرق معنوي والتفوق للحرف (A) يليه (B) وهكذا.

### 4-3-3 Gross pathological changing التغيرات المرضية العيانية

أظهر الفحص العياني لجرذان مجموعة الإنتان والمعاملة بالخلايا الجذعية ، وبعد انتهاء اليوم الأول على إحداث الإنتان ، تمثلت التغيرات المرضية العيانية باحتقان الاوعية الدموية في غشاء الخلب ، مع وجود بؤر نخرية منتشرة على سطح الكبد (شكل 45) ، وبعد 3 و 7 و 14 يوم من إحداث الإنتان لوحظ نفس التغيرات ، اما بعد 21 يوم فتمثلت التغيرات المرضية العيانية للجرذان وجود بقع نخرية شديدة منتشرة على الكبد والكلى ووجود خراجات على سطح الرئة واحتقان وتضخم القلب مع حدوث حالات التصاقات ليفينية للأمعاء .

### 4-3-4 Histopathological changes التغيرات المرضية النسجية

#### • مجموعة الجرذان المحدث فيها الإنتان :

**الكبد :** أوضح الفحص النسجي المجهرى لجرذان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً بعد 24 ساعة عن طريق ربط الاعور وثقبه ، نخر تجلطي للخلايا الكبدية مع الاحتقان الشديد في الوريد المركزي والشريان الكبدي في الباحة الكبدية ، مع إرتشاح للخلايا الالتهابية وبخاصة الخلايا اللمفية والبلعميات في المتن الكبدي مع ملاحظة ظاهرة الموت المبرمج لعدد من الخلايا الكبدية .

وبعد 3 و 7 أيام من إحداث الإنتان كانت التغيرات المرضية النسجية اكثر شدة ، إذ لوحظ النخر الشديد للخلايا الكبدية فضلاً عن الاحتقان الشديد لبعض الأوردة المركزية وملاحظة الخثرات الدموية في البعض الآخر منها (شكل 46).

**الرئة :** أظهر الفحص النسجي المجهرى للرئة بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان وجود حالة ذات الرئة الخلالي Interstitial pneumonia التي تميزت بوجود نضحة التهابية وأنزفة بين الاسناخ الرئوية فضلاً عن إرتشاح للخلايا الالتهابية التي سببت تتخن للحواجز بين هذه الاسناخ الرئوية ، وبعد 3 ايام لوحظ نخر وتوسف للخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية مع وضوح حالة النفاخ في الاسناخ الرئوية . أما بعد 7 أيام فكانت التغيرات اكثر شدة وتمثلت بتحطم في جدران الاسناخ الرئوية والنخر الشديد مع التوسف للخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات فضلاً عن الإرتشاح الشديد للخلايا الالتهابية (البلعمية واللمفية والعدلات) في نسيج الرئة وحول القصيبات الهوائية وكذلك حول الاوعية الدموية Peri-vascular and peri-bronchiolar cuffing ، التي كانت تعاني من تتخن في جدرانها واحتوائها على الخثرات الدموية (شكل 47).

**الكلية :** أظهر الفحص النسجي المجهرى بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان تجريبياً وجود تغيرات تمثلت بوضوح النزف الشديد بين النبيبات الكلوية وفي النسيج الخلالي فضلاً عن توسع في تجاويف هذه النبيبات ، فيما اظهرت مقاطع اخرى تنكس ونخر للخلايا الظهارية المبطننة للنبيبات الكلوية مع إرتشاح البؤري للخلايا الالتهابية . أما التغيرات المرضية النسجية للكبيبات الكلوية فتمثلت باتساع في حيز بومان الناجم عن انكماش في اللمة الكبيبية في حين ظهرت كبيبات اخرى تعاني من تحطم للغشاء القاعدي فيها ، وبعد 3 ايام فكانت الخلايا الظهارية المبطننة للنبيبات تعاني من نخر شديد وكذلك من موت مبرمج ، فضلاً عن نخر الخلايا الميزنكيمية Mesangial cells مع الإرتشاح للخلايا اللمفية ، وكانت التغيرات المرضية النسجية بعد 7 ايام أكثر شدة من التغيرات التي ظهرت بعد 3 ايام من إحداث الإنتان .

**القلب :** أظهرت المقاطع النسجية للقلب في جردان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً بعد 24 ساعة تغيرات مرضية تمثلت بنخر الخلايا العضلية القلبية Zenker's necrosis ، مع الوذمة الشديدة بين الالياف العضلية مع إرتشاحات للخلايا الالتهابية وبخاصة العدلات والخلايا اللمفية بين الالياف العضلية القلبية ، وبعد 3 و 7 أيام لوحظت نفس التغيرات المرضية ولكن بصورة أشد مع ملاحظة التثخن الشديد لجدار الاوعية الدموية بين الالياف العضلية القلبية ووجود الخثرة داخل هذه الاوعية الدموية (شكل 48).

• **مجموعة الجردان المحدث فيها الإنتان والمحقونة بالخلايا الجذعية اللحمية :**

**الكبد :** أوضح الفحص المجهرى النسجي بعد 24 ساعة من المعاملة وجود تغيرات خلوية ووعائية ، تمثلت بنزف في متن الكبد واحتقان شديد للأوردة المركزية والاعوية الدموية في الباحة البابية ، مع إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية وخاصة الخلايا اللمفية والعدلات والخلايا البلعمية حول الاوردة المركزية وفي الباحة البابية (شكل 49) ، فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية وخاصة الخلايا الكبدية حول الاوردة المركزية ، كذلك لوحظ ظهور بعض الخلايا الكبدية تعاني من الموت المبرمج (شكل 50) ، مع ملاحظة إرتشاح للخلايا الجذعية التي ظهرت بشكل مغزلي شبيه بالارومات الليفية Fibroblast وخاصة حول الاوعية الدموية في الباحة البابية والاوردة المركزية (شكل 51 و 52) . أما بعد 3 أيام ، فتمثلت التغيرات النسجية بالاحتقان الشديد للأوردة المركزية إضافة إلى توسع في الجيبانيات ، فضلاً عن النخر التجلطي للخلايا الكبدية . كما ولوحظ إرتشاح للخلايا الجذعية شبيه بالارومات الليفية حول الاوردة المركزية وفي الباحة البابية وفي الجيبانيات ، مع إرتشاح اعداد قليلة من الخلايا الالتهابية اللمفية والبلعمية حول الاوردة المركزية (شكل 53 و 54) .

وبعد 7 أيام ، لوحظ احتقان وتوسع للأوردة المركزية مع وجود الخثرة الدموية مع إرتشاح للخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية وعلى شكل تجمعات دائرية بالقرب من الباحة البابية (شكل 55 و 56) مع إرتشاح للخلايا الالتهابية في متن الكبد . وبعد 14 و 21 كانت الافات المرضية مشابهة للافات السابقة ولكن بصورة اشد إذ لوحظ توسع للأوردة المركزية بسبب النخر الشديد للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي مع ملاحظة الموت المبرمج لبعض الخلايا الكبدية (شكل 57).

**الرئة :** أوضح الفحص النسجي المجهرى للرئة بعد 24 ساعة من إحداث الإنتان وحقن الخلايا الجذعية وجود تغيرات نسجية تمثلت بإرتشاح الخلايا الالتهابية بين الاسناخ الرئوية وبخاصة الخلايا اللمفية والعدلات مع احتقان شديد للأوعية الدموية بين الاسناخ الرئوية ، فضلاً عن وجود النفاخ في الاسناخ الرئوية Pulmonary Emphysema ووضوح النزف بين الاسناخ الرئوية (شكل 58) .

وبعد 3 أيام من الحقن بالخلايا الجذعية تمثلت التغيرات المرضية النسجية بوضوح ظاهرة النفاخ الرئوي مع وجود للوذمة edema في الاسناخ الرئوية ، وبعد 7 أيام لوحظ تتخن شديد في جدران الاسناخ الرئوية نتيجة لإرتشاح الخلايا الالتهابية وخاصة اللمفية مع تكفف الخلايا اللمفية حول القصيبات الهوائية وبين الاسناخ الرئوية ، كما ولوحظ فرط تنسج الخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية (شكل 59) . اما بعد 14 و 21 يوم لوحظ وجود احتقان شديد للأوعية الدموية مع التتخن في جدران هذه الاوعية فضلاً عن النخر الشديد مع توسف Sloughing الخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات الهوائية ، فضلاً عن ما تقدم لوحظ أيضاً وضوح ظاهرة النفاخ في نسيج الرئة(شكل 60).

**الكلية :** أظهرت المقاطع النسجية في مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً والمحقونة بالخلايا الجذعية للحمية بعد 24 ساعة بانتفاخ الخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية والذي أدى إلى تضيق في تجايفها مع ملاحظة النزف في النسيج الخلالي ، فضلاً عن الإرتشاح البسيط للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية حول النبيبات الكلوية (شكل 61) وبعد 3 أيام من حقن الخلايا الجذعية اظهر الفحص النسجي وجود النخر التجلطي والموت المبرمج للخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية وكذلك نخر للخلايا الميزنكيمية في الكبيبات الكلوية مع إرتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية في النسيج الخلالي وبين النبيبات الكلوية (شكل 62 و 63) ، وبعد 7 لوحظ نخر في الخلايا

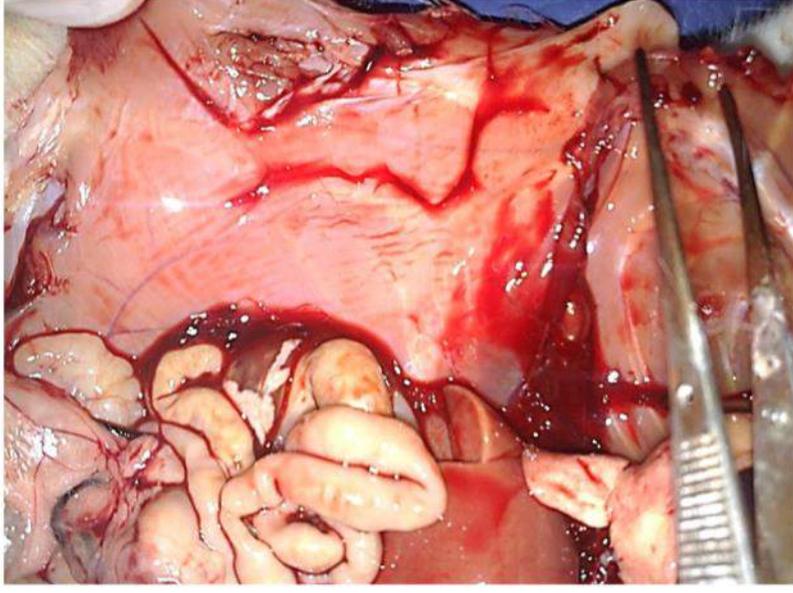
الظهارية المبطنة للنيبيات مع وجود نزف بين هذه النيبيات ، فضلاً عن إرتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية (شكل 64). وبعد 14 و 21 يوم من الإنتان وحقن الخلايا الجذعية للحمية كانت مشابهة للافات المرضية السابقة ولكن بصورة أشد تمثلت بالنخر الشديد للخلايا الظهارية المبطنة للنيبيات الكلوية مع ملاحظة التثخن في جدار الوعاء الدموي ووجود الخثرة الدموية(شكل 65) .

**القلب :** أظهرت المقاطع النسجية وبعد مرور 24 ساعة و 3 و 7 أيام من عملية حقن الخلايا الجذعية للحمية وجود تغيرات مرضية تمثلت باحتقان الاوعية الدموية بين الالياف العضلية القلبية مع إرتشاح للخلايا الالتهابية وبخاصة العدلات واللمفية وتكفها حول الاوعية الدموية وبين الالياف العضلية (شكل 66) ، كما ولوحظ تنكس زجاجي Hyalinization ونخر للخلايا العضلية القلبية ، فضلاً عن الوذمة والنزف بين الالياف العضلية (شكل 67) . كما ولوحظ إرتشاح للخلايا الجذعية للحمية الشبيهة بالارومات الليفية حول الاوعية الدموية وبين الالياف العضلية (شكل 68).

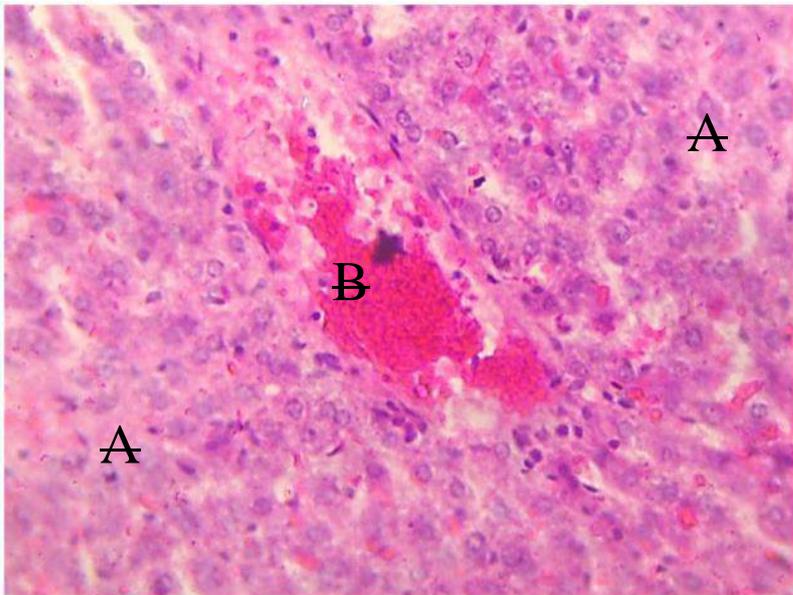
أما وبعد 14 و 21 يوم فكانت التغيرات المرضية اكثر شدة تمثلت بالنخر الشديد للعضلات القلبية مع ملاحظة الخثرات الدموية في الاوعية الدموية بين الالياف العضلية القلبية مع تثخن في جدران هذه الاوعية الدموية (شكل 69).

#### • الكشف عن المستعمرات الجرثومية في الانسجة المختلفة :

أظهرت المقاطع النسجية لجرذان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً والمصبوغة بملون كرام المحورة للنسيج (براون وبرين) تحديد لمستعمرات الجراثيم التي ظهرت بشكل مفرد أو على شكل تجمعات ملتصقة مع بعضها وبلون أزرق غامق إلى أسود في حين ظهر باقي النسيج بلون أصفر وفي كل من الكبد والكلية والرئة والقلب وخلال مدة التجربة ، إذ لوحظت مستعمرات الجراثيم في نسيج الرئة بعد 24 ساعة من الإنتان (الشكل 70) ، كما ولوحظ ظهور لمستعمرات الجراثيم في نسيج الكلية والكبد بعد 3 ايام من إحداث الإنتان ( الشكل 71 و 72) . أما في جرذان مجموعة الإنتان المحدث تجريبياً والمحقونة بالخلايا الجذعية للحمية ، فأظهرت المقاطع النسجية الملونة بصبغة كرام المحورة للنسيج تواجد لأعداد قليلة من مستعمرات الجراثيم ، فضلاً عن تلون للخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين أن باقي النسيج تلون باللون الاصفر إذ لوحظ تواجد مستعمرات قليلة للجراثيم في نسيج الرئة والكلية التي تلونت باللون الاسود في حين ظهرت الخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية بلون احمر (الشكل 73 و 74).

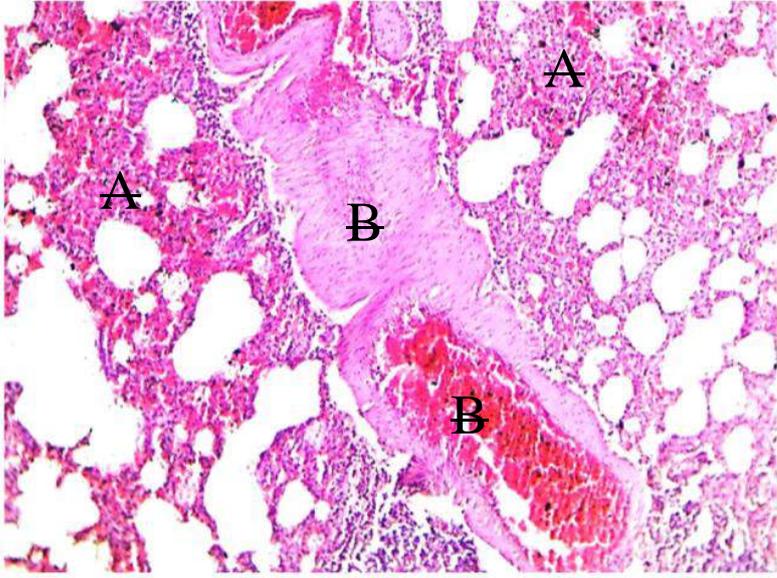


شكل (45) : مقطع عياني لجرذ بعد 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية ، يوضح احتقان الاوعية الدموية في غشاء الخلب



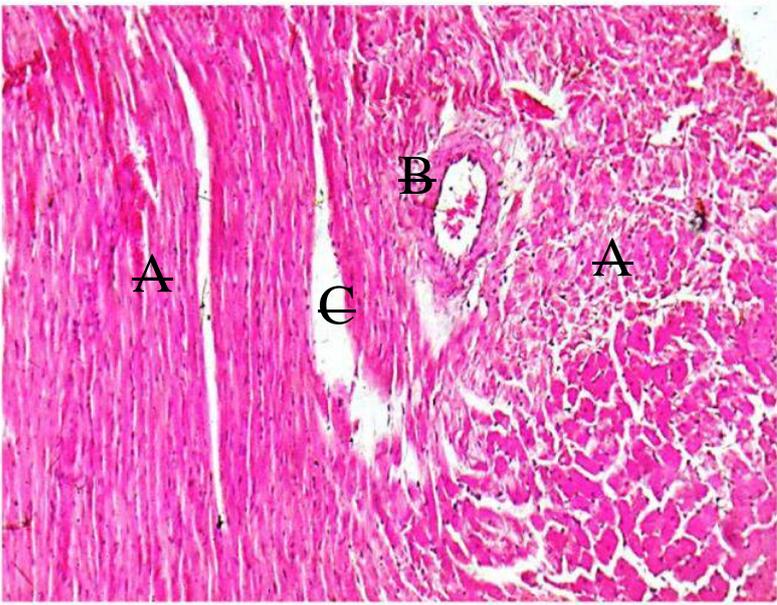
شكل (46) : مقطع نسجي لكبد جرذ بعد مرور 7 ايام من احداث الانتان ، يوضح النخر الشديد للخلايا الكبدية (A) مع وجود خثرة دموية حديثة التكوين في الوريد المركزي (B) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 142



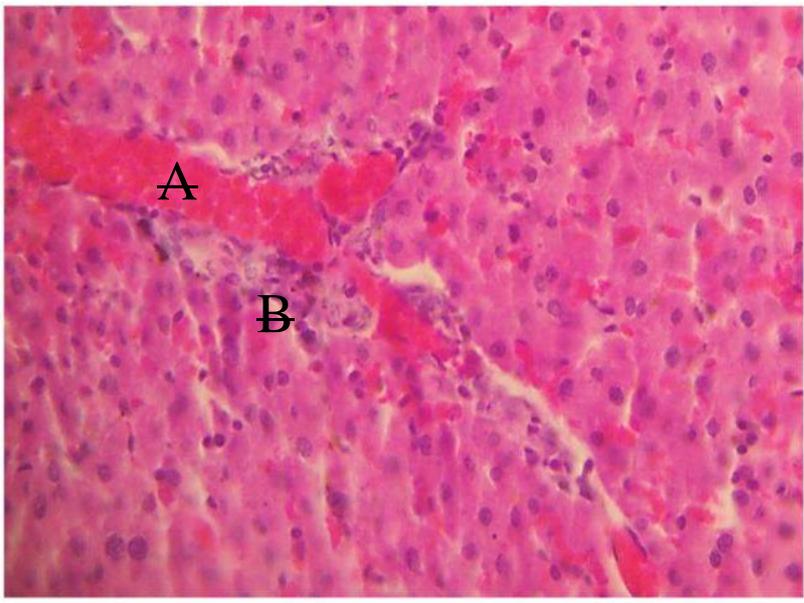
شكل (47) : مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 7 ايام من احداث الانتان ، يوضح تتخن جدار الاسناخ الرئوية بسبب ارتشاح الخلايا الالتهابية (A) مع وجود خثرة دموية حديثة التكوين وتتخن لجدار الوعاء الدموي (B) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 105



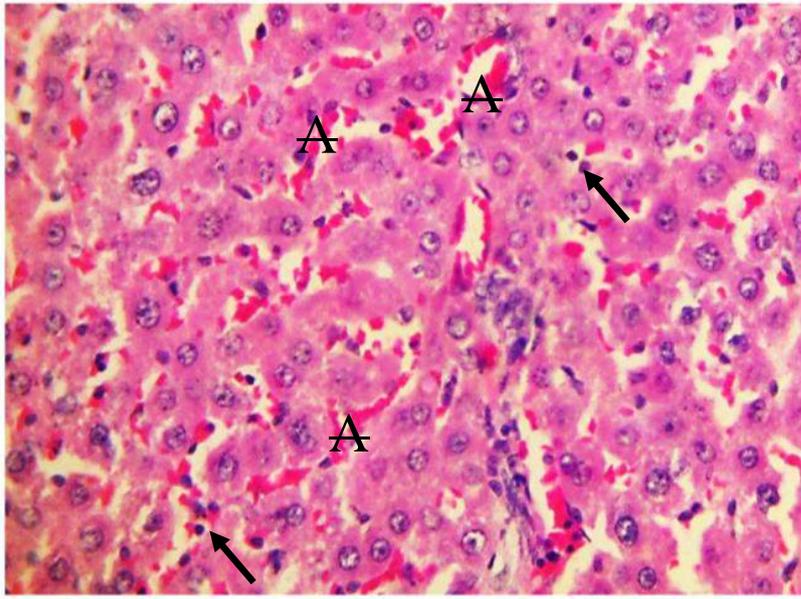
شكل (48) : مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 7 ايام من احداث الانتان ، يوضح النخر الشديد لعضلة القلب (A) مع تتخن لجدار الوعاء الدموي بين الالياف العضلية (B) فضلاً عن وضوح الودمة (C) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 42

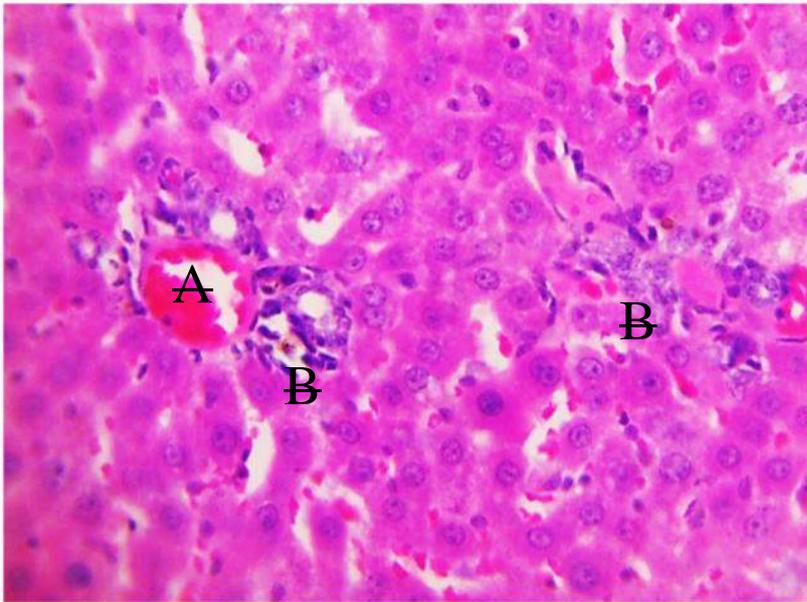


شكل (49) : مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان للاوعية الدموية في الباحة البابية (A) مع ارتشاح للخلايا الالتهابية حوله (B) .

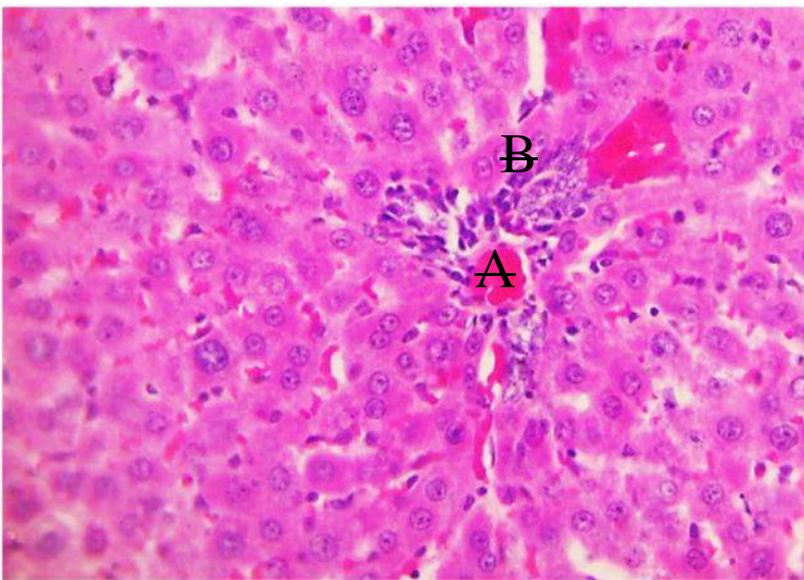
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين x 142



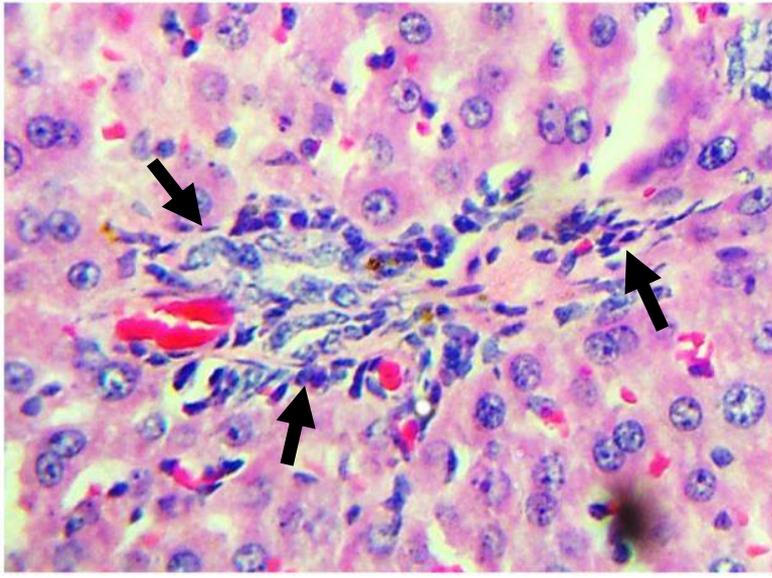
شكل (50) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الجيبيانيات (A) مع ملاحظة الموت المبرمج للخلايا الكبدية (السهم) . ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $350 \times$



شكل (51) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الوريد المركزي (A) مع ملاحظة ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية حول الوريد المركزي وفي الباحة البابية (B) . ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $420 \times$

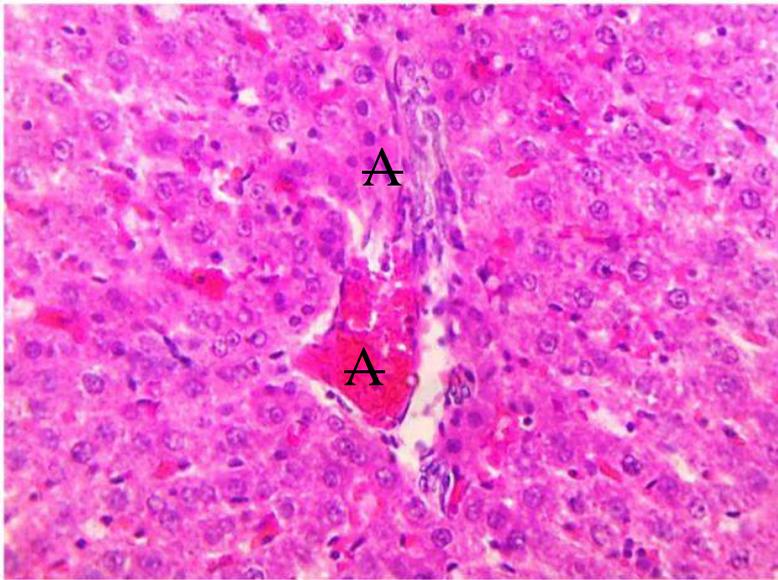


شكل (52) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الوريد المركزي (A) مع ملاحظة ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية حول الوريد المركزي (B) . ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $350 \times$



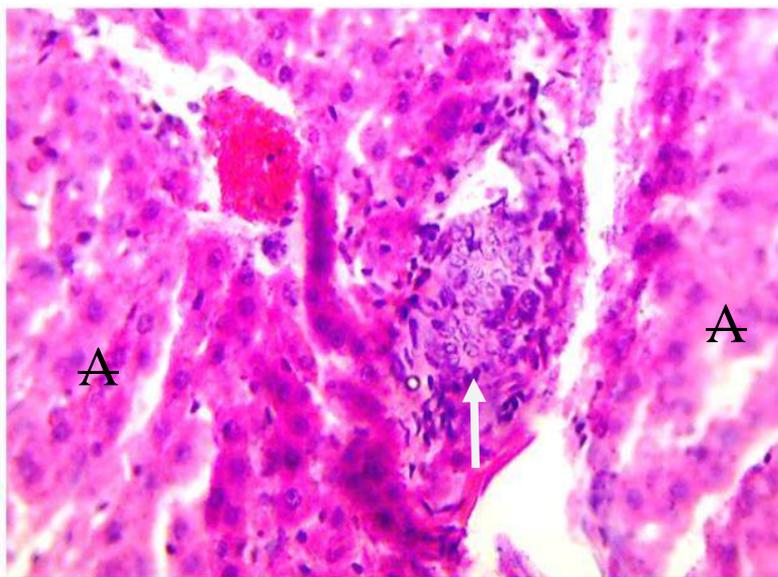
شكل (53) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 3 ايام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهه بالارومات الليفية في الباحة البابية (السهم) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $1440 \times$



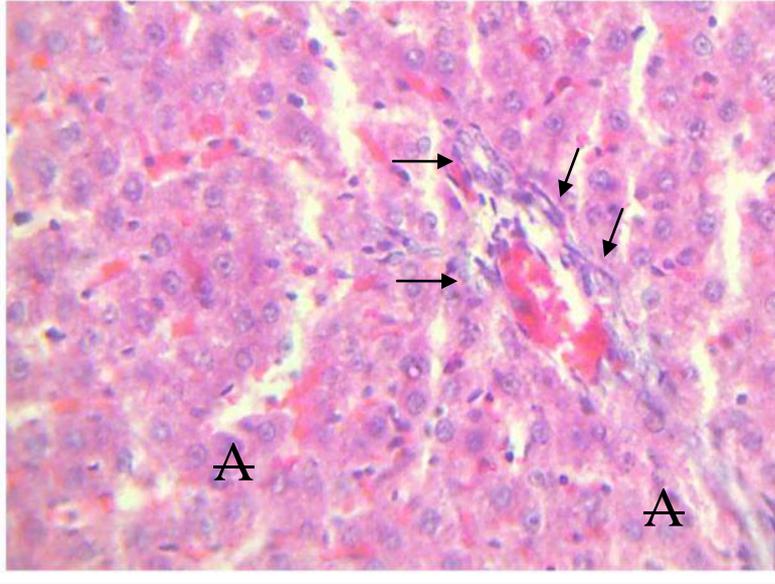
شكل (54) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 7 ايام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الوريد المركزي مع ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهه بالارومات الليفية (A).

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $350 \times$



شكل (55) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 7 ايام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهه بالارومات الليفية على شكل تجمعات في الباحة البابية (السهم) مع وجود نخر للخلايا الكبدية (A) .

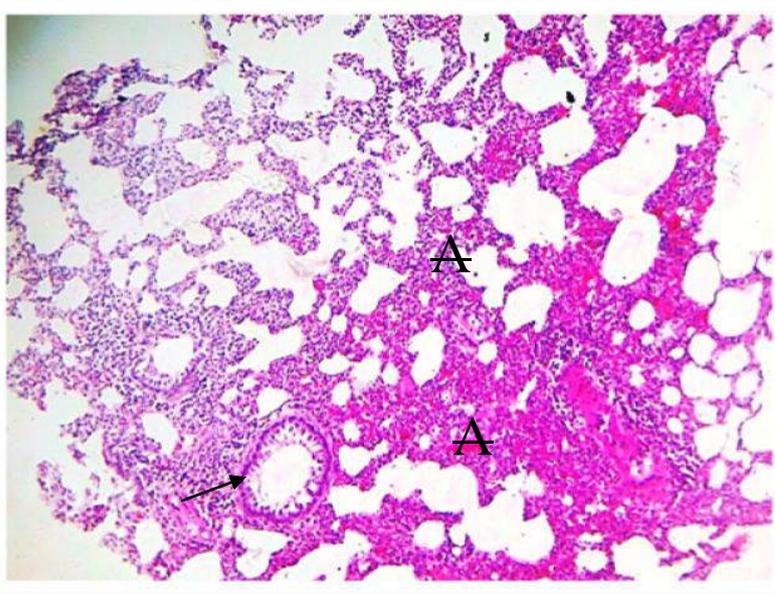
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $420 \times$



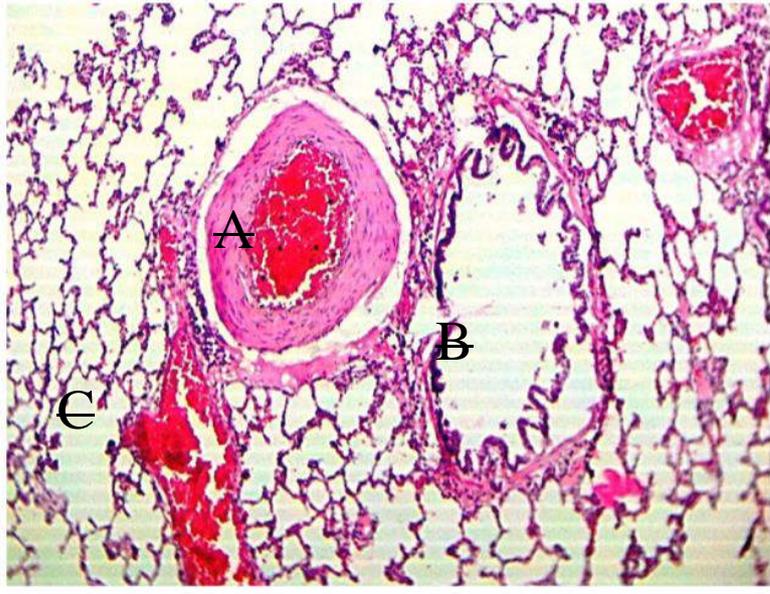
شكل (56) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 14 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية الشبيهة بالارومات الليفية في الباحة البابية ( السهم ) مع النخر الشديد للخلايا الكبدية (A) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 350 x



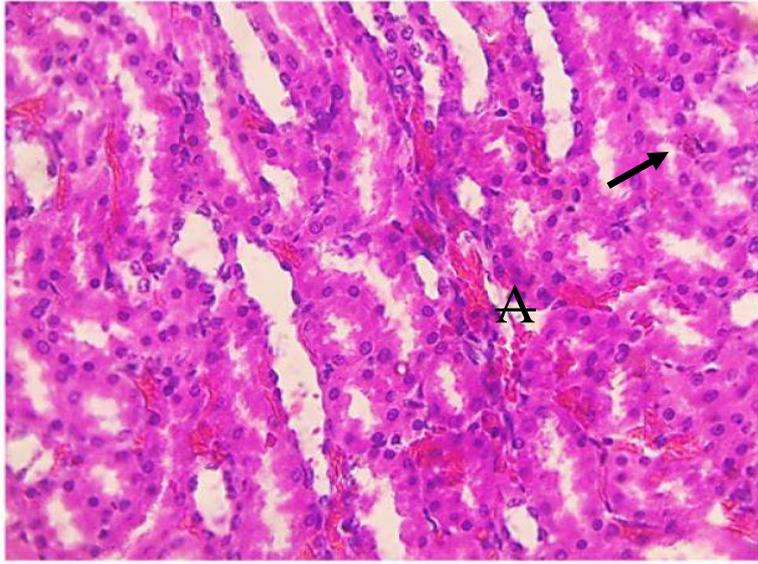
شكل (57) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان للاوعية الدموية مع تكلف الخلايا الجذعية حولها (A) فضلاً عن النفاخ (B) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 42 x



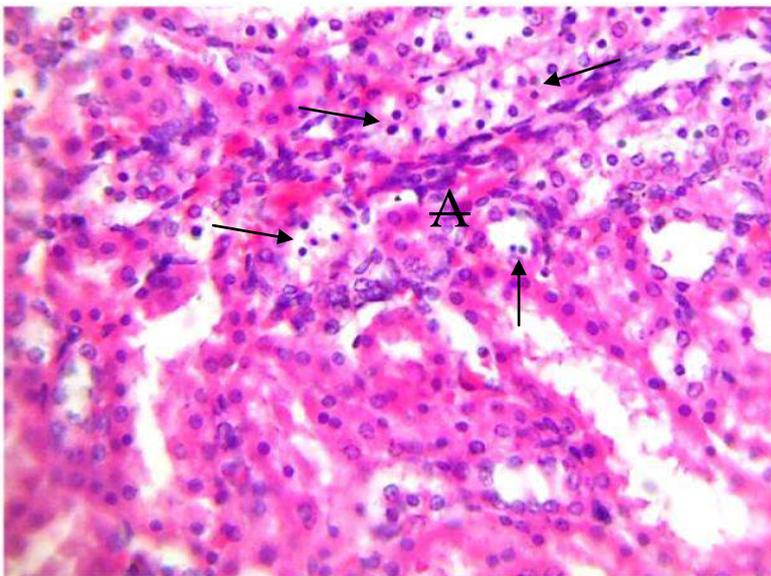
شكل (58) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 7 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح التتخن الشديد للانساخ الرئوي بسبب ارتشاح الخلايا الالتهابية (A) مع فرط تنسج ظاهرة القصيبات الهوائية (السهم)  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



شكل (59) مقطع نسجي لرتة جرد بعد مرور 14 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية يوضح التثخن الشديد لجدار للاوعية الدموية واحتقانها (A) مع نخر وتوسف لظهارة القصبليات الهوائية (B) ووضوح النفاخ في الاسناخ الرئوية (C) ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $42 \times$

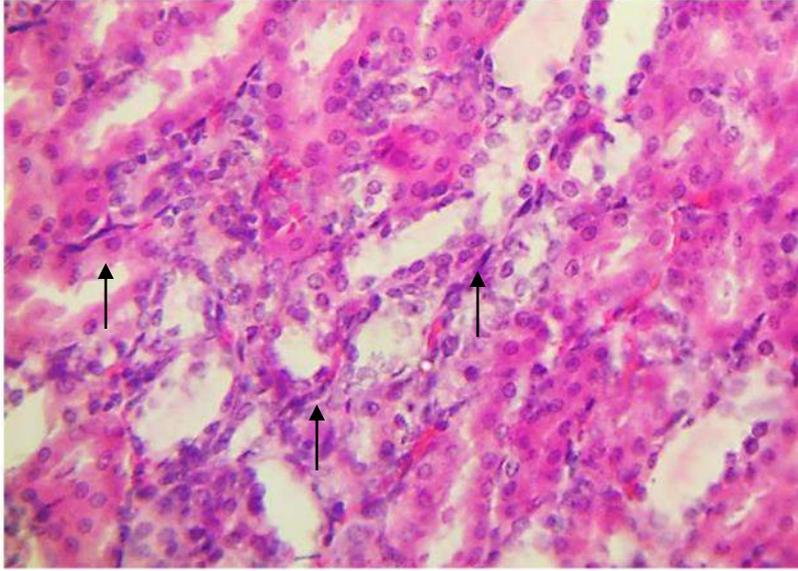


شكل (60) مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح النزف بين النبيبات الكلوية (A) مع انتفاخ الخلايا الظهارية المبطنة لهذه النبيبات (السهم) . ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $105 \times$



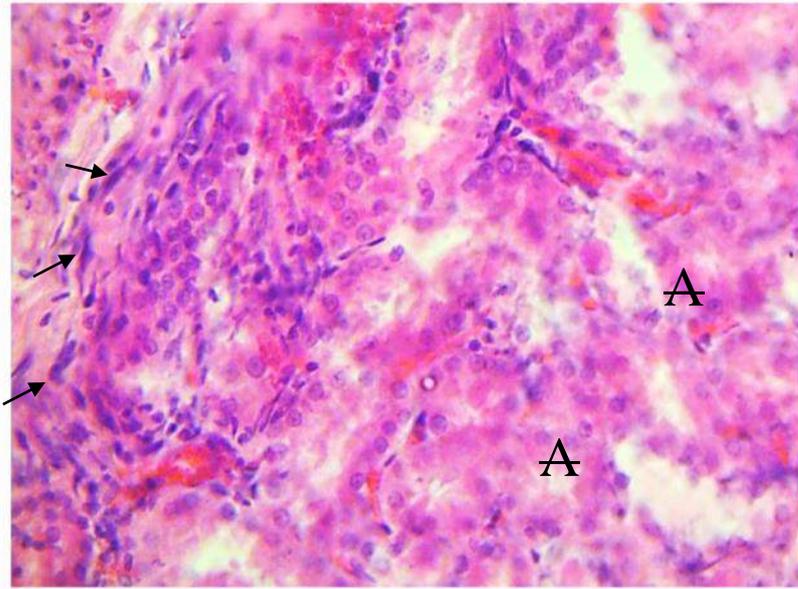
شكل (61) مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح الموت المبرمج لبعض الخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية (السهم) مع ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيهة بالارومات الليفية (A) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين  $142 \times$



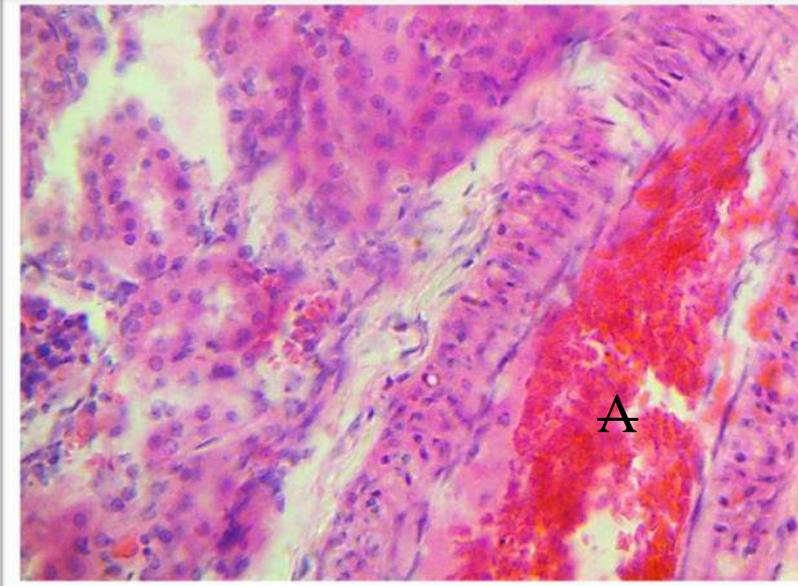
شكل (62) مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية اللحمية الشبيهة بالارومات الليفية بين النبيبات الكلوية ( السهم ) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



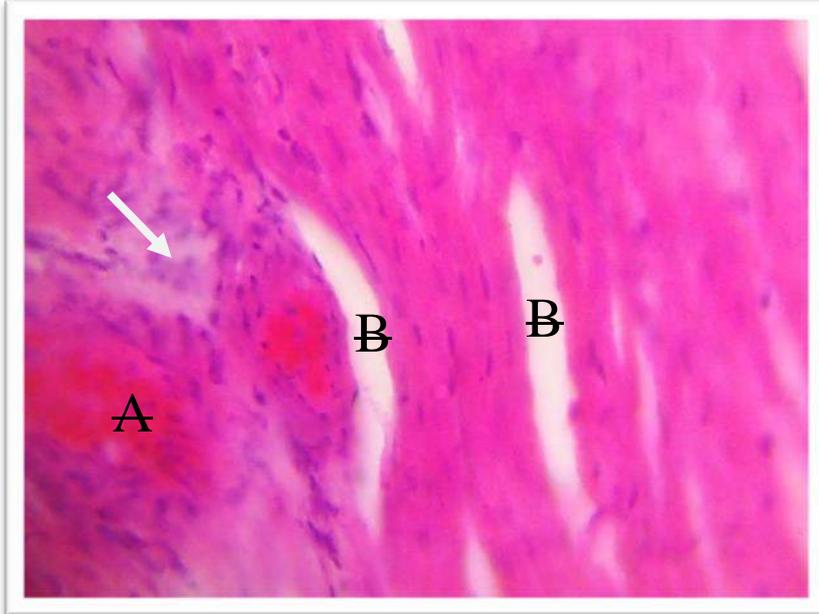
شكل (63) مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 7 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح نخر الخلايا الظهارية المبطننة للنبيبات الكلوية (A) مع ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية والخلايا الجذعية اللحمية الشبيهة بالارومات الليفية ( السهم ) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



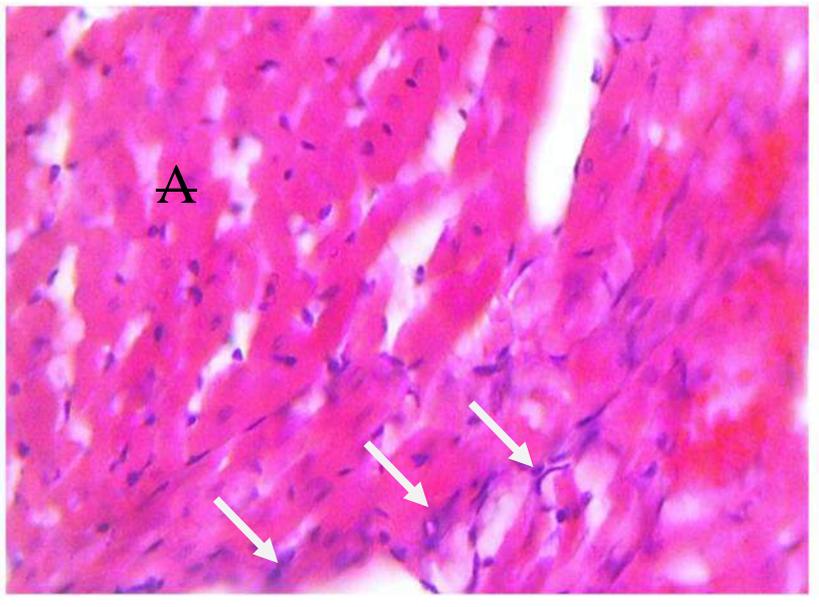
شكل (64) مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 14 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تثخن شديد لجدار الاوعية الدموية واحتوائه على الخثرة الدموية (A) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105 x



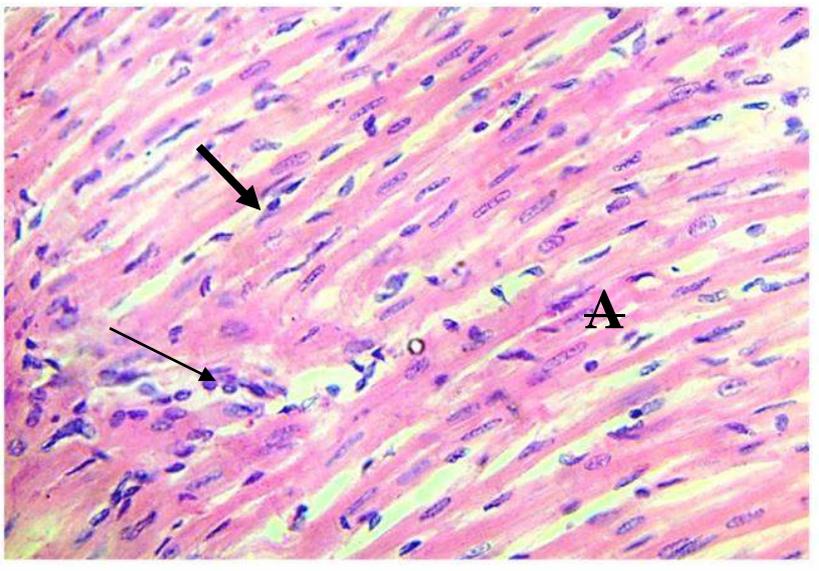
شكل (65) مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح احتقان الاوعية الدموية الشعرية بين الالياف العضلية القلبية (A) مع ارتشاح للخلايا الالتهابية وبخاصة العدلات واللمفية وبين الالياف العضلية (السهم) فضلاً عن وجود الوذمة (B) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



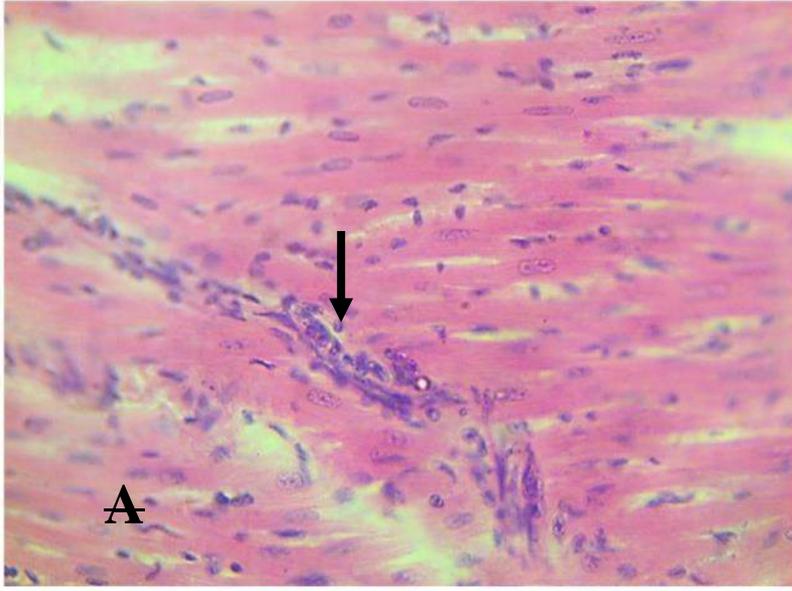
شكل (66) مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تنكس زجاجي Hyalinization ونخر للخلايا العضلية القلبية (A) ، فضلاً عن الوذمة والنزف بين الالياف العضلية مع ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيه بالارومات الليفية(السهم) .

ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x

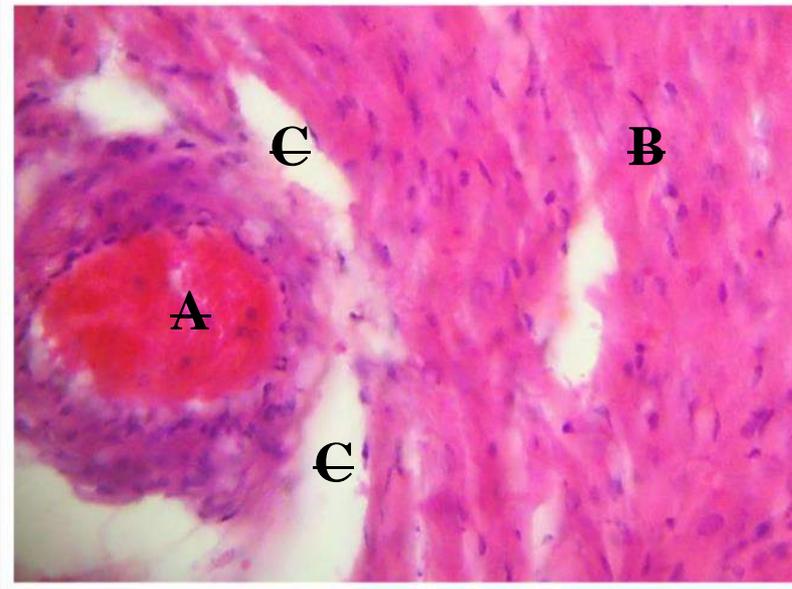


شكل (67) مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 7 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيه بالارومات الليفية بين الالياف العضلية (السهم) مع وجود النخر في الخلايا العضلية القلبية (A) .

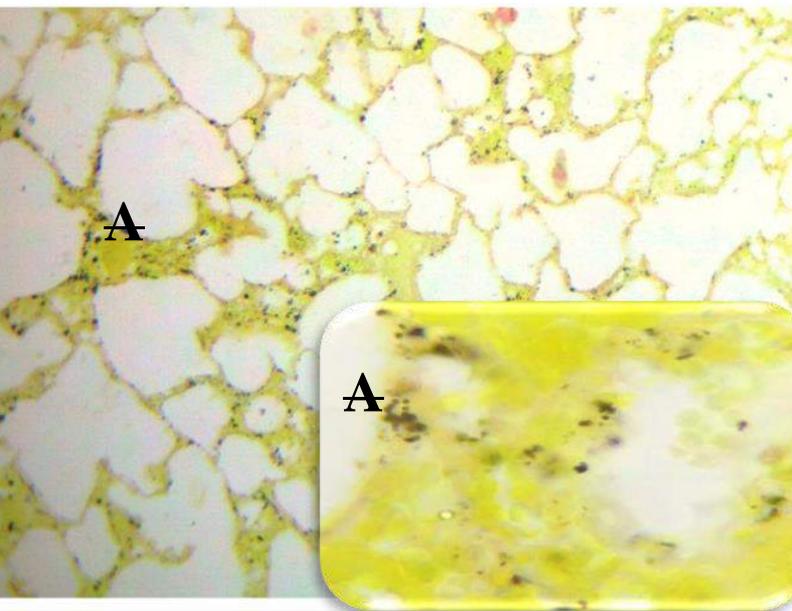
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



شكل (68) مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 14 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح ارتشاح للخلايا الجذعية اللحمية الشبيه بالارومات الليفية بين الالياف العضلية(السهم) مع وجود النخر في الخلايا العضلية القلبية (A) ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 105

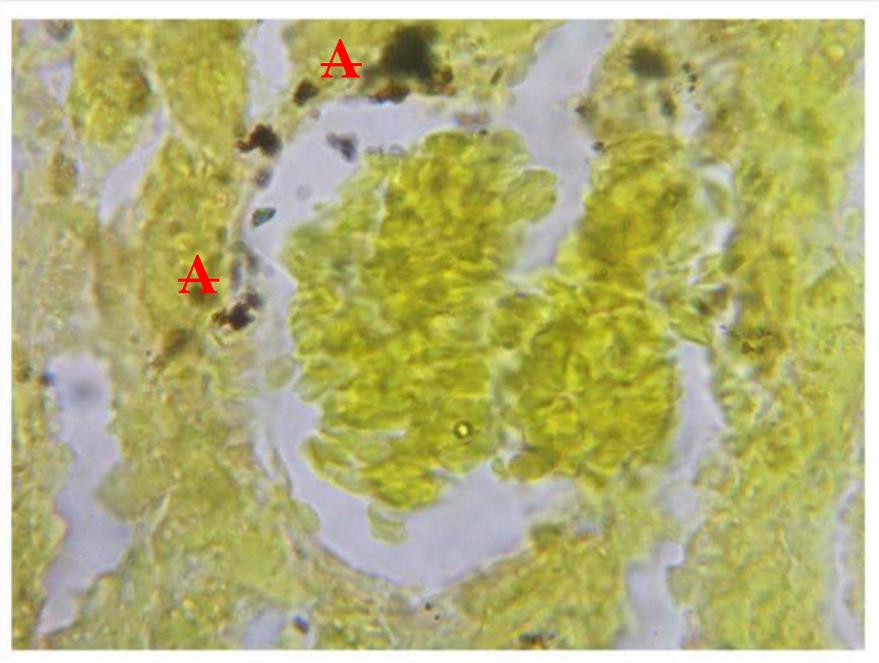


شكل (69) مقطع نسجي لقلب جرد بعد مرور 21 يوم من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تنخر في جدار الاوعية الدموية مع وجود الخثرة (A) فضلا عن وجود النخر في الخلايا العضلية القلبية (B) و الوذمة (C) .  
ملون الهيماتوكسيلين والايوسين 142 x



شكل (70) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 24 ساعة من احداث الانتان ، يوضح تواجد لمستعمرات الجراثيم في جدار الاسناخ الرئوية (A).

ملون الكرام المحورة للنسيج 42 x ، 1440 x



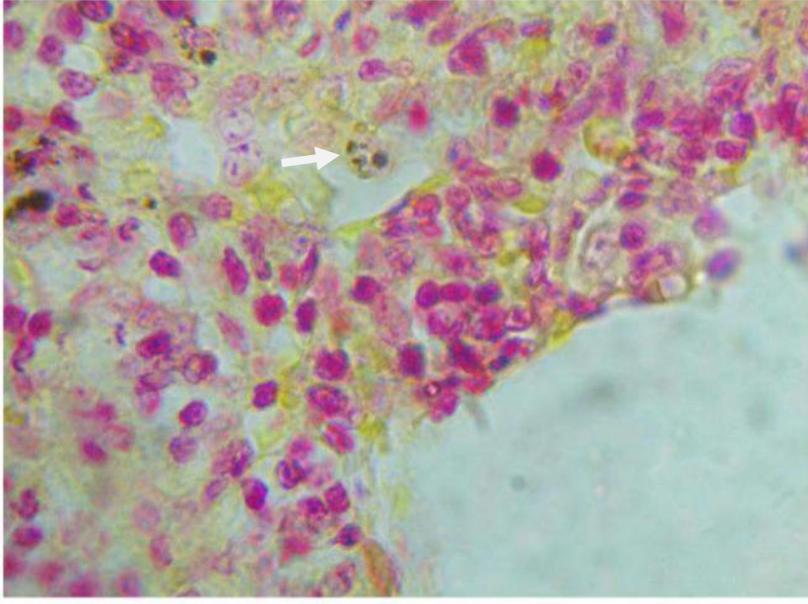
شكل (71) مقطع نسجي لكلىة جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح تواجد لمستعمرات الجراثيم في الكبيبة الكلوية (A).

ملون الكرام المحورة للنسيج x 1440



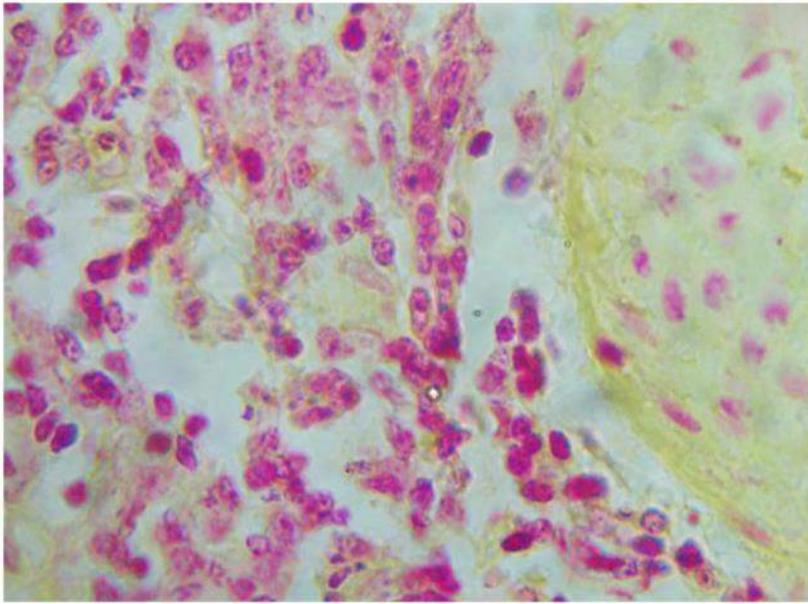
شكل (72) مقطع نسجي لكبد جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان ، يوضح تواجد لمستعمرات الجراثيم (A) .

ملون الكرام المحورة للنسيج x 1440



شكل (73) مقطع نسجي لرئة جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تواجد أعداد قليلة من مستعمرات الجراثيم (السهم) ، فضلاً عن تلون للخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين أن باقي النسيج تلون باللون الاصفر.

ملون الكرام المحورة للنسيج x 1440



شكل (74) مقطع نسجي لكلية جرد بعد مرور 3 أيام من احداث الانتان وحقن الخلايا الجذعية اللحمية ، يوضح تلون للخلايا الالتهابية والجذعية باللون الاحمر في حين أن باقي النسيج تلون باللون الاصفر.

ملون الكرام المحورة للنسيج x 1440

## الفصل الخامس

### 5- المناقشة Discussion

اجريت هذه الدراسة لغرض عزل الخلايا الجذعية البالغة من نقي عظم الجردان ، وبشكل خاص الخلايا الجذعية اللحمية وانماؤها وتكثيرها خارج الجسم الحي *In vitro* وذلك عن طريق زرعها في دوراق الزرع النسجي وباستخدام واستغلال الاماكانات البسيطة المتاحة وذلك لغرض استخدامها في تقليل الافات والاذى الناجم عن الانتان المحدث تجريبياً في الجردان بطريقة جراحية عن طريق ربط الاعور وتقبه *Cecal Ligation and Puncture* ، إذ ان أي محاولة لاستخدام الخلايا الجذعية في العلاج الخلوي يتطلب اولاً عزل هذه الخلايا ومن ثم تنميتها في مزارع خلوية بهدف الحصول على كميات وافرة منها تكفي للعلاج .

تعد الخلايا الجذعية اللحمية المشتقة من نقي العظام مصدراً مهماً للنقل والعلاج الخلوي ، وتمتاز هذه الخلايا الجذعية اللحمية بمميزات عديدة منها قدرتها على التجدد الذاتي *Self – renewing* ، والتمايز إلى انواع عديدة من خلايا نسيج واعضاء جسم الكائن الحي التي تختلف عن نسجها الاصل الذي نشأت منه ، هذه الخصائص والمميزات للخلايا الجذعية اللحمية جعلتها موضع اهتمام العديد من الاوساط العلمية والطبية وذلك لأمكانية استخدامها في العلاج التجديدي والخلوي للعديد من الامراض الخطرة .

### 1-5 المحور الاول :

#### عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الجردان

تم في هذه الدراسة عزل الخلايا الجذعية اللحمية من الانسجة البالغة المتمثلة بنقي العظام وبالأخص عظمتي الفخذ والساق وتنميتها خارج الجسم الحي ، إذ يعد نقي العظم واحداً من المصادر الغنية بالخلايا الجذعية وبشكل خاص الخلايا الجذعية المكونة للدم والخلايا الجذعية اللحمية واتفقت هذه النتائج مع كل من (Nadri and Soleimani , 2009 ; Lennon *et al.*, 2001; Nadri *et al.*, 2007) في حين أشارت دراسات اخرى إلى امكانية عزل الخلايا

الجدعية من انسجة واعضاء الجسم الاخرى مثل المشيمة ودم الحبل السري والسائل الامنيوتي وكذلك من الانسجة الدهنية ( السباعوي ، 2013 ، De Coppi ; Minter *et al.*, 2013 ; et al., 2010 ; Trivanovic *et al.*, 2013 ).

أظهرت نتائج هذه الدراسة امكانية عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية من الجردان واتفقت هذه النتائج مع ( Zhao *et al.*, 2011; Zhang and chan , 2010 ; karoaz *et al.*, 2009 ) ، وبينت نتائج بحوث عديدة امكانية عزل هذه الخلايا الجذعية من نقي عظام الانسان ( Jin *et al.*, 2013 ) وكذلك من حيوانات اخرى مختلفة مثل الخيول (Bosnakovski *et al.*, 2005) والابقار (Bourzac *et al.*, 2010) والكلاب (Black *et al.*, 2007 ; Laura *et al.*, 2008 ) والققط (Martin *et al.*, 2002) والارانب (Borena *et al.*, 2009) والاغنام والمعز ( Liu *et al.*, 2010 ; Kon *et al.*, 2000 ) .

تم من خلال هذه الدراسة عزل الخلايا الجذعية اللحمية باستخدام الطريقة التقليدية المتمثلة بزرع نقي العظم بشكل كامل في دوارق الزرع النسجي وباستخدام الوسط الزرعى DMEM ، واستخدمت هذه الطريقة من قبل (المولى ، 2013 ; Zhao *et al.*, 2011 ; Nadri and Soleimani , 2009 ; Jia *et al.*, 2009 ) ، وتلخصت هذه الطريقة التقليدية بحقن الوسط الزرعى في تجويف العظم الذي يقوم بدفع خلايا نقي العظم بشكل كامل إلى دورق الزرع النسجي وكررت هذه العملية مرات عدة حتى فرغت قسبة العظم من النقي ، وتعد الطريقة التقليدية لعزل الخلايا الجذعية اللحمية من الطرق السهلة التي تعتمد بشكل اساسي على قابلية الخلايا الجذعية اللحمية على الالتصاق بقعر دورق الزرع النسجي خلال الساعات الاولى من عملية الزرع الاولى ( Friedenstein *et al.*, 1974 ) ، وتتميز هذه الطريقة بكونها تقلل من عملية التلوث التي تحدث للمزارع النسجية خلال عملية الزرع التي تعد من اهم المعوقات التي تصاحب عملية عزل الخلايا الجذعية ، فضلاً عن أن استخدام هذه الطريقة تساعد الباحثين من الحصول على أكبر عدد ممكن من الخلايا الجذعية اللحمية التي تتميز بقلّة أعدادها في الانسجة البالغة . كما تتميز الطريقة التقليدية أيضاً بتوفير طيف واسع من تجمعات الخلايا

الموجودة في نقي العظم داخل دوارق الزرع النسجي التي تعد كطبقة مغذية تساعد في نمو هذه الخلايا الجذعية اللحمية من خلال العديد من عوامل النمو Growth factors ، مما يهيئ ظروف زرع مناسبة لنمو وتكاثر الخلايا الجذعية .

توجد طرق أخرى لعزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي العظام مثل استخدام الوسط المتدرج الكثافة (فارق الكثافة) Ficoll أو percoll ، الذي يقوم بعزل طبقة الخلايا وحيدة النواة Mononuclear layer عن باقي أنواع خلايا نقي العظم الأخرى ، إذ يتم إضافة نقي العظم المعزول إلى انبوب اختبار حاوي على Ficoll ومن ثم يتم إجراء الطرد المركزي إذ يلاحظ وجود طبقات عدة من ضمنها طبقة الخلايا وحيدة النواة التي تسمى بـ Buffy coat الحاوية على الخلايا الجذعية التي يتم زرعها في دوارق الزرع النسجي ( Waheed *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2009 ; Lennon and Caplan, 2006) أيضاً يتم عزل الخلايا الجذعية من نقي العظم عن طريق طحن عظام الساق والفخذ بعد التخلص من العضلات والأنسجة المحيطة في هاون خزفي مع إضافة الوسط الزرع ، بعدها يتم فصل مكونات نقي العظام عن مسحوق العظام عن طريق الترشيح (Zhu *et al.*, 2010 ; Brouand and Simmons , 2002) ، إلا أن هذه الطرق تكون

أكثر عرضة للتلوث وأكثر تعقيداً مقارنة مع الطريقة التقليدية المستخدمة في هذه الدراسة . أظهرت نتائج هذه الدراسة بعد عملية زرع نقي العظم وجود خلايا نقي العظم المختلفة فضلاً عن الخلايا الجذعية المتمثلة بالخلايا الجذعية اللحمية والخلايا الجذعية المكونة للدم في دورق الزرع النسجي التي ظهرت بشكل طافي في الوسط الزرع ، في حين لوحظ وجود أعداد صغيرة من الخلايا الملتصقة التي ظهرت مختلفة التكوين Heterogeneous وذات شكل مغزلي وبشكل منفرد وشبيه بالارومات الليفية الثنائية القطب Bipolar ، كما ولوحظ قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على تكوين تجمعات ومستعمرات خلوية التي تعد صفة مميزة لنمو وانقسام الخلايا الجذعية اللحمية ويطلق على هذه المستعمرات بـ Colony forming units (CFU) ، واتفقت هذه النتائج مع ما وجدته الباحثون (المولى ، 2013 ؛ السبعواوي ، 2013 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Nadri *et al.*, 2007) .

تم زرع الخلايا الجذعية اللحمية باستخدام الوسط الزرعي الخاص Dulbecco 's Modification Eagle's Media High Glucose (DMEM) ، ولم تتفق هذه الطريقة مع الباحث ( Jiang *et al.*, 2002 ) الذي بين أن عملية عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الجرذان يحتاج إلى عامل مثبط للوكيميا Leukemia inhibitory factor ، وكذلك إلى عوامل نمو مثل عامل النمو للبشرة Epidermal growth factor ، وعامل النمو المشتق من الصفائح Platelet – derived growth factor ، وهذه عوامل النمو تستخدم بشكل أساسي في عزل الخلايا الجذعية الجنينية .

تم أيضاً عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية في هذه الدراسة باستخدام ظروف زرعية تقليدية تمثلت بنسبة اوكسجين 95 % ونسبة غاز ثاني اوكسيد الكربون 5% باستخدام Candle jar ، وحضنت الخلايا الجذعية اللحمية في داورق الزرع النسجي بوجود الوسط الزرعي المزود بمصل جنين البقر Fetal bovine serum وبنسبة 10 % في درجة حرارة (37)م° ، واتفقت هذه الطريقة مع الطريقة التي استخدمها كل من (Jia *et al.*, 2009; المولى ، 2013 ; السبعوي ، 2013 )

إن نجاح عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية يعتمد على عوامل عديدة منها نسب كل من الاوكسجين وغاز ثنائي اوكسيد الكربون وكذلك نسبة مصل الجنين البقري ، إذ ان لنسبة الاوكسجين دور رئيساً في زراعة الخلايا الجذعية ، لذا استخدم الباحثون نسب مختلفة من الاوكسجين وكذلك نسب مختلفة من مصل الجنين البقري ومقارنتها مع ظروف الزراعة التقليدية بهدف الحصول على زراعة نموذجية لهذه الخلايا الجذعية اللحمية ، وهذا ما لاحظته ( Lennon *et al.*, 2001 ) ، الذي استخدم ظروف تقليدية لزراعة ونمو الخلايا الجذعية اللحمية متمثلة بـ 95 % هواء (20% اوكسجين) و 5% غاز ثاني اوكسيد الكربون CO<sub>2</sub> ، ومقارنتها مع ظروف زرعية قليلة الاوكسجين 5%، إذ سجل الباحث أن عملية عزل والتصاق الخلايا الجذعية اللحمية في الزرع الاولي كانت أفضل في ظروف زرعية قليلة الاوكسجين ، كذلك لاحظ زيادة وسرعة في تكاثر الخلايا الجذعية اللحمية مع زيادة في تكوين المستعمرات الخلوية في دوارق الزرع النسجي خلال ظروف الزرع قليلة الاوكسجين مع زيادة في اعداد وحيوية الخلايا الجذعية

المحصودة بعد عملية الزرع الاولي مقارنة مع تلك الخلايا الجذعية التي تم زرعها في الظروف الزراعية التقليدية ، في حين أظهرت نتائج الباحث (Cicione *et al.*, 2013) أن عملية زرع وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي عظام الجرذان باستخدام ظروف زرعية قليلة الاوكسجين تمثلت بـ 1% اوكسجين ، سبب ضعف وعدم قدرة الخلايا الجذعية اللحمية على التمايز إلى كل من بانيات العظم Osteoblasts وخلايا غضروفية ودهنية .

كما وأن لتركيز نسبة مصل الجنين البقري دور مهم في توفير ظروف زرعية مناسبة لنمو وتكاثر الخلايا الجذعية اللحمية داخل دوارق الزرع النسجي ، وهذا ما بينه الباحث (Wang *et al.*, 2012) إذ لاحظ إن عملية زرع الخلايا الجذعية وبوجود نسبة 15% من تركيز مصل الجنين البقري سبب زيادة وسرعة في تكاثر الخلايا الجذعية اللحمية ، فضلاً عن ظهور اسرع للمستعمرات الخلوية مقارنة زرع الخلايا الجذعية اللحمية بوجود 10% من تركيز مصل الجنين البقري ، أيضاً سجلت نتائج الباحث (Eslaminejad *et al.*, 2009) أن عملية زرع الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي عظام الجرذان وباستخدام ظروف زرعية تقليدية مع إضافة المصل الذاتي Autologous serum ، سبب زيادة في عملية الالتصاق والتكاثر للخلايا الجذعية اللحمية وكذلك زيادة في حيوية الخلايا الجذعية مع قدرة افضل على التمايز مقارنة مع تلك التي استخدم فيها مصل الجنين البقري في زراعة الخلايا الجذعية اللحمية .

## 2-5 المحور الثاني :

إحداث الأذى في مختلف أعضاء وأنسجة الجسم باستخدام الخمج متعدد الجراثيم

والمحدث تجريبياً عن طريق عملية ربط الاعور وثقبه

### Cecal ligation and Puncture

يتسبب الانتان بإحداث استجابة التهابية جهازية Systemic inflammatory response ، التي تحدث بسبب الخمج بالمسببات المرضية وخاصة الجرثومية ، الذي بدوره يسبب تحرير مستويات عالية من الوسيطات والسيتوكينات البادئة للالتهاب مما يسبب حدوث النفوق والأذى الكبير للانسجة والأعضاء المختلفة (Dejager *et al.*, 2011).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية امكانية إحداث حالة الانتان تجريبياً في الحيوانات المختبرية (الجرذان) باستخدام نموذج تدخل جراحي يطلق عليه ربط الاعور وثقبه CLP إذ اتفقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي استخدمت نفس الطريقة في الجرذان و الفئران ( Popov and Pavlov, 2013 ; Rittirsch *et al.*, 2008 ; Deitch, 2005 ; ) ( Wichterman *et al.*, 1980 ) تمثلت هذه الطريقة في إحداث تغيير واذى للحواجز الدفاعية الداخلية للحيوان وبخاصة الامعاء عن طريق إحداث ثقب متعددة في جدار الامعاء وبشكل خاص في الاعور مما يسبب في إحداث خمج للتجويف الخلي ، إذ يعد الاعور مصدراً داخلياً للخمج والتلوث الجرثومي ، مما يتسبب في إحداث حالة التهاب الخلب الجرثومي Peritonitis يتبعها انتقال الجراثيم المعوية المختلفة إلى المجرى الدموي مسببة حالة تجرثم الدم Bacteremia ووجود الذيفانات الجرثومية في الدم Toxemia ، التي بدورها تحفز الاستجابة الالتهابية الجهازية التي تتسبب في فشل وظيفي للأعضاء الحيوية Organ dysfunction مما يؤدي إلى حدوث الصدمة الانتانية Septic shock والنفوق (Dejager *et al.*, 2011) .

أظهرت نتائج معدلات البقاء على قيد الحياة في دراستنا الحالية انخفاض في معدلات البقاء (65%) للجرذان بعد 24 ساعة فقط من إحداث الانتان ، واستمر هذا الانخفاض مع مرور الوقت إذ لم يبق أي من جرذان مجموعة الانتان المحدث تجريبياً على قيد الحياة بعد مرور 7 أيام ، جاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات التي اجري فيها حالة الانتان تجريبياً للجرذان مع وجود اختلافات في نسب معدلات البقاء على قيد الحياة (Wei *et al.*, 2013 ; Ritter *et al.*, 2003) .

يتميز نموذج CLP لإحداث الانتان المستخدم في هذه الدراسة بإمكانية التلاعب به وتحويله لإحداث حالات انتان شديدة وحادة تتميز بمعدلات نفوق عالية في الحيوانات ، أو حالات انتان اقل شدة ومزمنة مع معدلات نفوق قليلة ، وذلك بالاعتماد على عوامل عدة مثل التحكم في موقع الربط Ligation الذي يتم عمله في الاعور ( Singleton and Wischmeyer , 2003 ) إذ كلما كان موقع الربط بعيد عن النهاية الميته للأعور أي بالقرب من الصمام اللفائفي الاعوري ، زادت من كمية الفضلات التي تطرح إلى التجويف الخلي ومن ثم زادت من شدة حالة الانتان المحدثه ، كذلك عدد الثقوب التي يتم إحداثها في جدار الاعور التي يتناسب عددها طردياً مع شدة الانتان ، فضلاً عن سمك حجم الابرة المستخدمة في إحداث هذه الثقوب (Otero-Antón *et al.*, 2001) ، إذ لوحظ في دراسة اجريت على الفئران والجرذان استخدم فيها طريقة CLP لإحداث الانتان تجريبياً ، أن عمل ثقبين اثنين في جدار الاعور وباستخدام ابرة سمك 16G سبب إحداث حالات انتان اكثر شدة مع انخفاض في معدلات البقاء على قيد الحياة للحيوانات مقارنة مع تلك التي تم عمل ثقبين اثنين في جدار الاعور وباستخدام ابرة سمك 21G أو 24G ( Manezes *et al.*, 2008 ) في حين أوضحت نتائج دراسة اخرى اختلاف كبير في شدة الانتان المحدث تجريبياً بطريقة CLP ، وكذلك في معدلات البقاء على قيد الحياة في الحيوانات التي تم عمل ثقوب في جدار الاعور تراوحت اعدادها ما بين 2 و 6 و 12 ثقباً . إذ لوحظ أن الحيوانات التي أحدث فيها 6 و 12 ثقب في جدار الاعور سجلت نسب نفوق ما بين 40 - 100 % وبعد يومين اثنين فقط من إحداث الانتان مقارنة مع تلك الحيوانات التي تم عمل ثقبين اثنين فقط في جدار الاعور (Benjamin *et al.*, 2000) ، وقد يعود السبب في هذه الاختلافات إلى أن ظروف تربية الحيوانات تختلف من ناحية نوعية الغذاء المستخدم وهذا يسبب اختلافاً في نوعية الجراثيم

المعوية intestinal flora في حيوانات التجارب والبحوث فضلاً عن الاختلاف في كمية الفضلات المتحررة من الثقوب في جدار الاعور والاختلافات الفردية Individual variation للاستجابة الالتهابية ضد المسببات المرضية .

ان إحداث الانتان تجريبياً بطريقة CLP ، يؤدي إلى تحرير مستويات عالية من الساييتوكينات والوسيطات البادئة للالتهاب وبشكل خاص عامل نخر الورم  $TNF-\alpha$  والانتروكينات IL-6 و IL-1 ، التي تؤدي إلى حدوث حالة فرط الالتهاب Hyper- inflammation ، التي تكون مترافقة مع معدلات عالية من النفوق ( Burkovski et al. 2013 ; Remick et al., 2005 ) . إذ إن المستويات العالية لهذه الوسيطات والساييتوكينات الالتهابية تؤدي إلى حدوث عرقلة Damping للوظائف المناعية وحدث حالة التثبيط المناعي الذي يعد الطور الثاني لحالة الانتان الذي يتسبب أيضاً بحدوث معدلات عالية من النفوق ( Richard et al 2013 ; Muenzer et al., 2010 ) .

لاحظ الباحثون امتلاك الوسيطات والساييتوكينات الالتهابية وبخاصة عامل نخر الورم الفا  $TNF-\alpha$  والانتروكين IL-1 ، تأثيراً مباشراً على أغشية الخلايا البطانية للاوعية الدموية إذ تقوم هذه الوسيطات الالتهابية بتحفيز عامل النسيج Tissue Factor ، الذي يسبب زيادة في إنتاج الثرومبين Thrombin ، الذي يعد بحد ذاته من الوسيطات الالتهابية البادئة للالتهاب ويتسبب هذا الثرومبين في إحداث تكتل لليفين Fibrin في داخل الاوعية الدموية ، أيضاً تسبب هذه الوسيطات الالتهابية خلل واضطراب في عملية تحلل الليفين وذلك من خلال انتاج كميات كبيرة من Plasminogen activator inhibitor -1 ، الذي يعد من المثبطات القوية لعملية تحلل الليفين ( De Jong et al., 2010 ; Aird, 2005 ) .

خلال حالة الانتان تتحفز جزيئات الالتصاق Adhesion molecules على اغشية الخلايا البطانية مثل عامل النمو البطاني الوعائي vascular endothelial growth factor ( VEGF ) و جزيئات الالتصاق خارج الخلية Intercellular adhesion molecules ICAM-1 ، فضلاً عن Selectin E & P ( Mok *et al.*, 2013 ) ، مسببة حدوث التفاعل والارتباط بين الخلايا البطانية وكريات الدم البيض وكذلك التصاق ألصفيحات الدموية مسببة حالة من الخثرات الدموية الصغيرة والمنتشرة التي يطلق عليها DIC التي تعد واحدة من الآليات التي تسبب الفشل الوظيفي للانسجة والاعضاء الحيوية وتزيد من معدلات النفوق ( Song *et al.*, 2005 ; Zeerleder *et al.*, 2013 ) .

وأظهرت نتائج الفحص العياني والنسجي للجرذان وجود تغيرات مرضية في العديد من الاعضاء المتنبية وبشكل خاص في الكبد والرئة والكلية والقلب والامعاء ، وهذا يؤكد حدوث الخمج المتعدد الجراثيم Polymicrobial sepsis ووصول الجراثيم وذيفاناتها إلى الاعضاء والانسجة المختلفة إذ يتسبب الانتان بإحداث العديد من التغيرات المرضية مع حدوث فشل وظيفي وبشكل خاص في الرئة إذ يتسبب الانتان بإحداث حالات الاصابة الرئوية الحادة Acute Lung Injury والفشل الكلوي الحاد Acute kidney failure وكذلك الفشل الكبدي الحاد Acute liver failure (Abraham and Singer , 2007) وتمثلت هذه التغيرات المرضية النسجية بالنزف والاحتقانات مع وجود التخر في النسيج الخلالي فضلاً عن إرتشاح أَلخَليَا الالتهابية ، واتفقت نتائج الفحص النسجي في دراستنا مع العديد من البحوث والدراسات إذ أشارت نتائج الباحث ( Cadirci *et al.*, 2011 ) إلى وجود تغيرات مرضية في كل من الرئة والكلية بعد إحداث الانتان تجريبياً في الجرذان عن طريق CLP ، تمثلت بوجود نضحة التهابية في نسيج الرئة مكونة بشكل أساسي من الخلايا اللمفية مع تواجد لأعداد قليلة لخلايا الحمضات ، فضلاً عن تغيرات مرضية في كل من القصيبات الهوائية والاسناخ الرئوية وجدران الاوعية الدموية ، وفي الكلية كانت التغيرات المرضية النسجية عبارة عن فرط تصبغ Hyperchromasia في كل من الخلايا الميزنكيمية للنبيبات الكلوية والخلايا الظهارية للنبيبات الكلوية فضلاً عن إرتشاح أَلخَليَا الالتهابية والاذى في جدران الاوعية الدموية.

ان ظهور الآفات المرضية وتطور الاستجابة الالتهابية بعد عملية إحداث الانتان تجريبياً يعود إلى قدرة الجراثيم المخمجة و ذيفاناتها على إحداث الضرر لأنسجة الجسم من خلال امتلاكها للعديد من عوامل الفوعة التي تسهل التصاق الجراثيم بأغشية خلايا المضيف وانتشارها في الأنسجة ، كما أنها تعيق من عمليات القتل والتخلص من الجراثيم عن طريق البلعمة والاستجابة المناعية (Ramachandran , 2014) ، وأن هذه القدرة الإراضية للجراثيم وذيفاناتها وما تسببه من ضرر نسجي تكون كفيلة بأثارة الاستجابة الالتهابية ضدها من قبل جسم المضيف ، التي تكون عادة بشكل مفرط في حالة الانتان Hyper- inflammatory responce التي تتميز بتحرير مجموعة كبيرة من الوسيطات والسيتوكينات الالتهابية مثل عامل نخر الورم الفا TNF- والانتروكينينات وبخاصة IL-1 و IL-6 ، هذه الوسيطات والسيتوكينات الالتهابية تسبب تفعيل منتشر للاستجابة الالتهابية الجهازية ، ومن ثم تتحرر كميات كبيرة من الوسائط الموسعة للأوعية الدموية مثل البروستاغلانينات Prostaglandines والثرومبوكسان A2 وواوكسيد النتريك NO ، فضلاً عن إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية (Burkovskiy et al., 2013 ; Dejager et al., 2011) .

ان وصول الدفاعات الخلوية كالعدلات والبلعمات الكبيرة إلى موقع الإفة لازالة الجراثيم الغازية يتسبب أيضاً بإحداث ضرر نسجي اضافي ، من خلال تحرير محتويات الاجسام الحالة الذي يحدث غالباً بعد موت هذه الخلايا الدفاعية ، وتتمثل محتويات الاجسام الحالة العديد من البروتينات الحامضية Acid protease ، والخمائر مثل Collagenase و Elastase و Cathepsin ، فضلاً عن الجذور الحرة Free radicals و التي تسبب تحطيم لأغشية الخلايا (Pinheiro da Silva and Nizet , 2009) .

تلعب أنواع الاوكسجين الفعالة Reactive oxygen species(ROS) وبشكل الجذور الحرة التي تتحرر سواءً من قبل الجراثيم الممرضة أم من الخلايا البلعمية والخلايا البطانية Endothelium ، دوراً مهماً في إحداث الاذى خلال الانتان (Galley , 2011) التي تسبب حدوث أكسدة الدهون Lipid peroxidation وبشكل خاص الدهون الموجودة في غشاء الخلايا Lipoprotein مسببة تحرير الجذور الحرة المتمثلة بالسوبر أوكسايد وبيروكسيد الهيدروجين ، وان زيادة توليد الجذور الحرة تؤدي بالتالي إلى استنزاف مضادات الأكسدة مسبباً حالة من عدم التوازن بين الاكسدة ومضادات الاكسدة oxidant-anti-oxidant imbalance

في الجسم ، إذ يسبب الانتان المحدث تجريبياً في الجرذان بواسطة نموذج CLP ، ارتفاعاً معنوياً في الاجهاد التأكسدي داخل الانسجة من خلال ارتفاع مستويات الجذور الحرة في كل من أنسجة الرئة والكبد والكلية والقلب من خلال الارتفاع الشديد لمستويات كل من انزيم myeloperoxidase وانزيم Lipid peroxidase داخل الانسجة ، مع وجود انخفاض معنوي في مستويات كل من superoxide dismutase (SOD) و Total glutathione (Koksal *et al.*, 2004 ; Cadirci *et al.* 2011) .

ان تأثيرات هذه الجذور الحرة على هذه الانسجة تم من خلال الاذى الذي تسببه للخلايا البطانية في الاوعية الدموية مع تشكيل عوامل الانجذاب الكيميائي مسبباً إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية وبشكل خاص العدلات التي تسبب زيادة في مستويات الوسيطات والساييتوكينات الالتهابية (Andrades *et al.*, 2009 ; Barichello *et al.*, 2006) إذ تسبب هذه الجزيئات والجذور الحرة بإحداث اذى وضرر للخلايا البطانية مما يؤثر بشكل كبير على آلية التجهيز الدموي وعمل الشعيرات الدموية الدقيقة Microvascular ، الذي يسبب انخفاض في التجهيز الدموي الضروري للخلايا والانسجة مسبباً حدوث حالات النخر والموت المبرمج للخلايا ومن ثم تسبب الخلل الوظيفي للأعضاء Multi-organ dysfunction .

تلعب خلايا الدم البيض وبخاصة العدلات والصفائح الدموية دوراً رئيساً في مرضية الانتان إذ تقوم هذه الخلايا الدفاعية بقتل مسببات المرضية عن طريق آليتين رئيسيتين ، الاولى من خلال عملية البلعمة لهذه المسببات وقتلها بالانزيمات الهاضمة مثل protease وجزيئات الاوكسجين الفعالة ROS ، أما الآلية الثانية فتتم عن طريق تحرير الحبيبات Degranulation التي من خلالها يتم تحرير حبيبات مليئة بالبروتينات المضادة للجراثيم والانزيمات الهاضمة إلى البيئة المحيطة ومن ثم تقوم بقتل مسببات المرضية القريبة (Mantovani *et al.*, 2011) ، فضلا عن وجود آلية ثالثة التي هي عبارة عن تكوين ما يعرف بالفخاخ خارج الخلوي للعدلات Neutrophils extracellular traps (NETs) (Meng *et al.*, 2012 ; Ma and Kubes , 2007) وهي عبارة عن تراكيب خارج خلوية شبيهة بالشبكة التي تتكون عندما تقوم خلايا العدلات بتحرير جزيئات من الحمض النووي الجيني مشبعة ببروتينات وانزيمات مضادة للجراثيم مثل الهستونات Histones وانزيم

الميلوبيريوكسيديز myeloperoxidase والايلاستيز Elastase والكاثيسين Cathepsin-G وان عملية تكوين هذه الفخاخ تسمى NET-osis التي تعدُّ مساراً لموت الخلايا يختلف عن كل من موت الخلايا خلال التنخر أو الموت المبرمج (McDonald *et al.*, 2012) .

تتم عملية تكوين هذه NETs من خلال تحفيز لخلايا العدلات بواسطة انزيم يطلق عليه NADPH oxidase مسبباً انحلال dissolution لكل من الغشاء النووي وغشاء الحبيبات الهيولية مما يسمح للكروماتين بالاختلاط مع البروتينات والانزيمات المضادة للجراثيم التي يتم طرحها إلى البيئة المحيطة خارج الخلية ، أيضاً تلعب الصفائح الدموية المتحفزة دوراً رئيساً في تكوين NETs ، إذ تتفاعل وترتبط هذه الصفائح الدموية مع العدلات وتشارك بمحاصرة الجراثيم المنتشرة في المجرى الدموي خلال الانتان ( Ma and Kubes , 2007 ) .

## 3-5 المحور الثالث :

## دراسة تأثير حقن الخلايا الجذعية اللحمية في الحد من أو تقليل

## الآفات المرضية الناجمة عن الإنتان

أظهرت نتائج زرع الخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد الذيلي Tail vein للجرذان المحدث بها الإنتان عن طريق نموذج CLP ، تحسناً في معدلات البقاء على قيد الحياة مقارنة مع جردان مجموعة الإنتان لوحده ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات والبحوث التي استخدمت الخلايا الجذعية اللحمية مع حالات الإنتان المحدث تجريبياً (Mei *et al.*, 2009 ; Nemeth *et al.*, 2009 ; Gupta *et al.*, 2007) ، إذ سجلت نتائج الباحث Nemeth تحسناً معنوياً في معدلات البقاء على قيد الحياة من 1-50% بعد مرور 4 أيام من إحداث الإنتان تجريبياً في الفئران باستخدام نموذج CLP مع حقن الخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد ، كما سجلت أيضاً نتائج كل من (Gonzalez-Rey *et al.*, 2009) تحسناً كبيراً في معدلات البقاء على قيد الحياة من 20-80% بعد اليوم العاشر وباستخدام نفس نموذج الإنتان .

إلا أن نتائج هذه الدراسة اختلفت مع الباحث ( Mei *et al.*, 2010 ) ، إذ لم يسجل الباحث أي تحسن ملحوظ في معدلات البقاء على قيد الحياة بعد عملية حقن الخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد على الرغم من وجود انخفاض في معدلات السايبتوكينات البادئة للالتهاب وبخاصة كل من عامل نخر الورم الفا TNF- $\alpha$  والانتروكين IL-6 ، فضلاً عن وجود مستويات عالية من الانتروكين IL-10 ، مع ملاحظة تحسن في وظيفة الاعضاء الحيوية وكذلك زيادة في معدلات التخلص من الجراثيم Bacterial clearance للحيوانات التي احدث بها الإنتان تجريبياً ، في حين سجل الباحث انه عند اعطاء المضادات الحياتية مع الخلايا الجذعية اللحمية سبب تحسناً معنوياً في معدلات البقاء على قيد الحياة .

ان فرط الالتهاب Hyper inflammation الذي يحدث في المراحل الاولى للإنتان الذي يكون مترافقاً مع تحرير مستويات عالية من الوسيطات والسايبتوكينات الالتهابية تؤدي إلى حدوث الصدمة والنفوق في الحيوانات ، وتلعب الخلايا الجذعية اللحمية دوراً مهماً من خلال إحداث حالة التوازن بين كل من الوسيطات البادئة للالتهاب والوسيطات المانعة للالتهاب إذ تقوم الخلايا الجذعية اللحمية بوظائف صماوية ونظيرة الصماوية Endocrine and paracrine

من خلال افراز العديد من الساييتوكينات المضادة للالتهاب والبروتينات القاتلة للجراثيم فضلاً عن العديد من عوامل النمو Growth Factors (Mundra *et al.*, 2013 ; Vandervelde *et al.*, 2005) إذ تمتلك الخلايا الجذعية القابلية على تحفيز تحرير IL-10 الذي يعد من الساييتوكينات المضادة للالتهاب الذي تحرره الخلايا البلعمية ، فضلاً عن تحفيز الخلايا البلعمية وزيادة عمليات البلعمة وبالتالي زيادة في عمليات التخلص من الجراثيم (Iyer and Rojas , 2008) . كما أن الذايفانات الجرثومية وخاصة الذايفان الداخلي Endotoxin للجراثيم السالبة الكرام تعمل على تحفيز مستقبلات Toll-like receptors TLR4 ، الموجودة على اغشية الخلايا الجذعية للحمية مما يتسبب في تحفيزها ومن ثم في زيادة تحرير انزيم Cyclooxygenase-2 الذي يقوم بتحفيز تحرير البروستاغلاندين PGE2 ، الذي يعدُّ احد مضادات الالتهاب (Javaregowda *et al.*, 2013 ; Nemeth *et al.*, 2009) .

أظهرت نتائج صورة الدم في الحيوانات التي احدث فيها الانتان تجريبياً وجود انخفاض معنوي في كل من العدد الكلي لكريات الدم البيض والصفائح الدموية وفي نسبة الخلايا اللمفية بعد مرور 24 ساعة و 3 أيام من إحداث الانتان ، واتفقت هذه النتائج مع كل من (Col and Keskin , 2013 ; Remick *et al.*, 2005 ; Dragica *et al.*, 2004) ، في حين اختلفت مع كل من (Souza Neto *et al.*, 2006 ; Xiao *et al.*, 2006) اللذين سجلوا وجود زيادة في العدد الكلي لكريات الدم البيض وفي الخلايا اللمفية بعد إحداث الانتان تجريبياً وسجلت نتائج حقن الخلايا الجذعية للحيوانات التي احدث بها الانتان تحسناً ملحوظاً في صورة الدم المتمثلة بالعدد الكلي لكريات الدم البيض والصفائح الدموية وكذلك في نسب الخلايا اللمفية .

إن قلة كريات الدم البيض leukopenia الذي يحدث خلال الانتان يكون سببه الرئيسي هو حدوث موت مبرمج للخلايا اللمفية مسبباً قلة اللمفاويات lymphopenia (Atmatzidis *et al.*, 2011 ; Wesche-Soldato *et al.*, 2005) . يحدث الموت المبرمج للخلايا عن طريق العديد من المحفزات مثل المواد الستيرويدية steroids والساييتوكينات

مثل TNF و الانترلوكين IL-6 و IL-1 وكذلك FasLgand ( FasL ) و جذور الاوكسجين الحرة واوكسيد النتريك فضلاً عن الخلايا اللمفية السمية Cytotoxic T-Lymphocyte التي تمتلك مستقبلات ( FasL ) على اسطحها إذ ترتبط مع الخلايا المخمجة التي تمتلك مستقبلات Fas-receptors (Strasser *et al.*, 2000) . إن مستقبلات Fas تتواجد على العديد من انواع الخلايا الموجود داخل الجسم والمتضمنة الخلايا اللمفية المتحفزة من نوع T و B ووحيدات النواة والبلعمات والعدلات فضلاً عن انواع من الخلايا غير المناعية مثل خلايا الكبد والرئة والقلب (Wesche-Soldato *et al.*, 2005) ، تتحفز هذه المستقبلات عندما ترتبط مع Ligands مثل FasL مسبباً تحفيز نوع من إشارات الموت داخل الخلية التي تسبب تنشيط انزيمات خاصة تسمى بـ Caspases وخاصة Caspase8 و Caspase3 ، اللذان يسببان تحفيز لأنزيم DNase الذي يسبب موت الخلايا المبرمج ( Hotchkis and Nicholson , 2006 ) .

طبيعياً يحدث الموت المبرمج للتخلص من الخلايا اللمفية النشطة ، وكذلك تقليل الاذى الناجم من تجمعات الخلايا الالتهابية خلال الاستجابة المناعية . في حالة الانتان يحدث الموت المبرمج وبشكل غير منتظم في الخلايا اللمفية في كل من التوتة والطحال وفي تجمعات الخلايا اللمفية في الامعاء مسببة حالة من التثبيط المناعي مما يقلل من قدرة المضيف على مقاومة الخمج الجرثومي ، فضلاً عن انخفاض مستويات الانترفيرون IFN- $\gamma$  الذي يُعدُّ محفزاً قوياً للخلايا البلعمية التي تساهم في عملية التخلص من مسببات المرضية والخلايا الميتة ، لذلك فإن عدم قدرة الجسم على التخلص من الخلايا اللمفية الميتة نتيجة للخلل في وظيفة البلعمات الكبيرة الذي يحدث في حالة الانتان مسبباً أذى اضافي مستمر للانسجة والاعضاء المخمجة ( Vandivier *et al.*, 2002 )

ان الانخفاض الشديد للصفائح الدموية الذي يحدث خلال الانتان يكون نتيجة لانخفاض في انتاج هذه الصفائح الدموية من نقي العظام أو بسبب الزيادة في عمليات التخلص والتحلل لهذه الصفائح الدموية ، فضلاً عن زيادة في تكوين معقدات العدلات - الصفائح الدموية (PNCs) Platelet - neutrophils complexes التي

تتكون استجابة لحدوث الخمج الجرثومي وظيفاته ، التي تعد احد الطرق لصيد المسببات المرضية وعرقلة حركتها ومن ثم زيادة في معدلات التخلص من الجراثيم ( Spaggiari and Weyrich , 2011 ; Ma and Kubes , 2007 ) .

تمتلك الصفائح الدموية مستقبلات TLR4 التي تكون مسؤولة على التعرف على المسببات المرضية او مكوناتها الخلوية وبشكل خاص متعدد السكريد الببتيدي LPS مما يتسبب في تحفيز هذه الصفائح الدموية (Clark *et al.*, 2007) إذ سجلت نتائج ( Semple *et al.*, 2007 ) زيادة في عمليات البلعمة للصفائح الدموية التي حدث لها ارتباط مع LPS ، الا أن النقص الذي يحدث في اعداد الصفائح الدموية خلال الانتان له علاقة عكسية مع شدة الانتان وكذلك مع معدلات النفوق ( Soriano *et al.*, 2005 ; Mavrommatis *et al.*, 2000 ) .

بينت نتائج المحور الثالث المتعلقة في مستوى البروتين التفاعلي سي ، وجود تحسن وانخفاض في مستوياته للجرذان التي حقنت بالخلايا الجذعية اللحمية مقارنة مع تلك التي احدث فيها الانتان تجريبياً . يعد البروتين التفاعلي سي احد بروتينات الطور الحاد Acute phase proteins التي تلعب دوراً هاماً من خلال تحفيزها للمناعة الطبيعية Innate immunity للمضيف وإزالة الخلايا التالفة وتنظيم الاستجابة الالتهابية وتحفيز الوسيطات الأخرى مثل السايوكينات ويعد البروتين التفاعلي سي المؤشر الحيوي Biomarker للعديد من الحالات المرضية ( Cray *et al.*, 2009 ; Póvoa , 2002 ) ، يتم تصنيع هذه البروتينات في الكبد كاستجابة لتحرير الانترلوكينات والسايوكينات الالتهابية وخاصة IL-6 ، إذ يبدأ إفراز وتحرير هذه البروتينات بعد مرور من 4-6 ساعات من التحفيز وتتضاعف مستوياتها لتصل إلى القمة بعد مرور 36-50 ساعة ( Kocabas *et al.*, 2007 ; Gabay and Kushner , 1999 ) ، إذ ان خلال الخمج الجرثومي ، يرتبط البروتين التفاعلي سي مع المكونات الخلوية للجراثيم مثل متعدد السكريد الشحمي LPS بوجود ايونات الكالسيوم Ca<sup>+</sup> ، وكذلك يرتبط مع مكونات اغشية الخلايا الميتة وبشكل خاص مع الفوسفوكولين Phosphocholine التي يتسبب في تحفيز لمسارات المتمم ، إذ تلعب هذه البروتينات دوراً في تحفيز عملية البلعمة

مستقبلات التعرف على النمط pattern recognition receptor (Póvoa , 2002) ، إذ يعد واحداً من أهم

إلى جانب المتمم فان البروتين التفاعلي سي هو بروتين الطور الحاد الوحيد الذي يشارك بشكل مباشر في عملية التخلص وإزالة الجراثيم Bacterial clearance ، إذ لوحظ قدرة هذا البروتين على تحفيز آلية السمية الخلوية Cytotoxicity من خلال تفعيل وتنشيط العدلات ، وتحفيز عملية إزالة الحبيبات Degranulation للصفائح الدموية ، فضلاً عن تحفيز نشاط الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural killing cells) (Póvoa, 2002 ; Szalai et al., 1995 ; et al., 2000) .

ان ارتفاع مستويات البروتين التفاعلي سي خلال الانتان تتناسب طردياً مع شدة الانتان وكذلك مع معدلات النفوق ، إذ سجل الباحثون (Lobo ; Wang et al., 2013 ; et al., 2003) وجود ارتباطاً وثيقاً بين مستويات البروتين التفاعلي سي مع شدة الانتان وكذلك مع معدلات النفوق العالية .

أوضحت نتائج الفحص المجهرى لأنسجة الجرذان التي احدث فيها الانتان تجريبياً والمحقونة بالخلايا الجذعية اللحمية وجود تحسناً في الاعضاء والانسجة المتضررة ، واتفقت هذه النتائج مع كل من (Mei et al., 2007 ; Hall et al., 2013 ; Elman et al., 2014 ; Xu et al., 2007 ; Ortiz et al., 2007 ; 2007) ، وسجل الباحث (Weil et al., 2009) تواجد كثيف للخلايا الجذعية اللحمية في كل من الرئة والكبد بعد إحداث الانتان تجريبياً عن طريق حقن متعدد الببتيدات السكري LPS- induced sepsis في حين اوضحت نتائج الباحث (Nemeth et al., 2009) أن التركيز العالي للخلايا الجذعية اللحمية كان في كل من الرئة والكلية والطحال كاستجابة للانتان المحدث عن طريق CLP .

ان هجرة وتوجيه الخلايا الجذعية اللحمية يشابه وبشكل كبير حركة وهجرة كريات الدم البيض باتجاه الانسجة المتضررة عن طريق الانجذاب الكيماوي Chemotaxis من خلال امتلاك الخلايا الجذعية اللحمية على العديد من المستقبلات مثل السلكتين Selectin والانتكرين Integrin (Mok et al., 2013) ، وتمتلك ايضاً الخلايا الجذعية اللحمية على العديد من جزيئات الالتصاق Adhesion molecules ومن أهم هذه الجزيئات هو جزيئات

التصاق الخلايا الوعائية (VCAM-1) Vascular cell adhesion molecules ، الذي يلعب دوراً رئيساً في تنظيم هجرة الخلايا الجذعية للحمية بعد تحفيزها من قبل عامل نخر الورم (Ren *et al.*, 2010 ; Segers *et al.*, 2006) ، إذ تلتصق Pavmentation وتتدرج Rolling الخلايا الجذعية للحمية على بطانه الاوعية الدموية مما يسبب تباطؤ في سرعة جريان الخلايا الجذعية للحمية ومن ثم انسلالها Migration ، من بين الحيزات الضيقة الموجودة بين الخلايا البطانية في جدران الاوعية الدموية (Mok *et al.*, 2013) بسبب العديد من الوسيطات وعوامل النمو المختلفة التي تعمل على جذب هذه الخلايا الجذعية للحمية إلى موقع الانسجة المتضررة مثل Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) و قلة الاوكسجين Hypoxia و البروتين الجاذب لوحيدات النواة Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) وعامل النمو البطاني الوعائي (VEGF) Vascular endothelial growth factor والانتروكينات IL-6 و IL-8 . (Tatsumi *et al.*, 2008 ; Chamberlain *et al.*, 2007; Rochefort *et al.*, 2006 ) .

خلال الانتان يتأثر نسيج الرئة بشكل كبير إذ لوحظ إرتشاح كثيف للخلايا الالتهابية وبخاصة العدلات والخلايا اللمفية بين الاسناخ الرئوية ، واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج العديد من الدراسات (Mei *et al.*, 2010 ; Mei *et al.*, 2007 ; Gupta *et al.*, 2007) وأن عملية حقن الخلايا الجذعية للحمية للحيوانات المحدث بها الانتان ادى إلى انخفاض شدة التهاب الرئة من خلال انخفاض إرتشاح الخلايا الالتهابية .

ان الخلايا الجذعية للحمية تقوم بتحرير البروستاغلاندين PGE2 الذي يعد واحداً من العوامل الحيوية في تقليل الالتهاب ، إذ يسبب تحرير PGE2 زيادة في تحفيز الخلايا البلعمية المتواجدة في الانسجة المتضررة على تحرير IL-10 خلال الانتان ، وأن عملية تنظيم تحرير هذا السايبتوكين من قبل الخلايا البلعمية يكون مسؤول عن زيادة في معدلات البقاء على قيد الحياة وكذلك في تحسين وظائف الاعضاء الحيوية (Nemeth *et al.*, 2009 ; Spaggiari *et al.*, 2009) . كما وتقوم الخلايا الجذعية للحمية بأفراز بروتينات مهمة مثل Stimulated Gene / protein 6 ، الذي يتفاعل مع مستقبلات CD44 الموجودة على الخلايا البلعمية المتواجدة داخل الانسجة المتضررة مما يسبب تنظيم تثبيطي Down-regulation لعامل النواة

Nuclear Factor ( NF-kB ) مما يسبب تثبيط افراز عامل نخر الورم TNF- $\alpha$  من هذه الخلايا البلعمية (Gonzalez-Rey *et al.*, 2009 ; Iyer and Rojas, 2008).

أظهرت نتائج هذه الدراسة حدوث حالات من موت الخلايا المبرمج في الخلايا الكبدية وفي الخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات الكلوية بعد إحداث الانتان تجريبياً وانفقت هذه النتائج مع ما وجدته الباحثون ( Lerolle *et al.*, 2010 ; Tapfer *et al.*, 2003 ; Hotchkiss *et al.*, 2003 ) ، إذ اوضحت دراسات عديدة قدرة الخلايا الجذعية للحمية على تقليل الموت المبرمج للخلايا من خلال امتلاكها للعديد من الآليات المضادة لموت الخلايا المبرمج مثل قدرتها على اصلاح DNA الخلايا ، وتثبيط مسارات موت المتقدرات وكذلك من خلال زيادة فعاليات مضادات الاكسدة (Murphy *et al.*, 2013) ، هذه الآليات تكون مهمة خلال الانتان ، إذ بين (Yagi *et al.*, 2010) قدرة الخلايا الجذعية للحمية على تقليل حالات الموت المبرمج في خلايا نسيج الرئة والكلية للجرذان التي تم احداث الانتان فيها تجريبياً عن طريق نموذج حقن LPS ، أيضاً سجل الباحث (Mei *et al.*, 2010) انخفاض في موت الخلايا المبرمج للفئران التي احداث فيها الانتان تجريبياً عن طريق نموذج CLP بعد حقنها بالخلايا الجذعية للحمية .

تلعب الخلايا الجذعية للحمية دوراً مهماً في العمليات الترميمية والعلاجية وذلك من خلال العديد من الآليات منها عملية اندماج Infusion لهذه الخلايا الجذعية للحمية مع خلايا النسيج المتضررة إذ تقوم الخلايا الجذعية بنقل المكونات الخلوية الحيوية إلى الخلية المتضررة (Mok *et al.*, 2013 ; Plotnikov *et al.*, 2008) . كذلك تقوم الخلايا الجذعية للحمية بوظائف افرازية للعديد من الساييتوكينات وعوامل النمو المختلفة التي تقوم بتقليل حالات الالتهاب والموت المبرمج للخلايا فضلاً عن تحفيزها لعملية تكوين اوعية دموية جديدة Angiogenesis (Wannemuehler *et al.*, 2012 ; Kinnaird *et al.*, 2004) .

أيضاً تقوم الخلايا الجذعية للحمية على تحفيز تكاثر وتمايز للخلايا الجذعية المتواجدة في الاعضاء والانسجة المتضررة ومن ثم تحفز تكوين خلايا جديدة والبدء بعمليات الاصلاح والتجدد ، و اوضح كل من ( Crisan *et al.*, 2008 ; Caplan , 2008 ) ، أن الخلايا

الجدعية اللحمية التي اطلق عليها اسم Pericyte والمتواجدة حول الاوعية الدموية لديها القابلية على افراز كميات كبيرة من الجزيئات الحيوية Bioactive molecules التي تمتلك خصائص تحوير مناعي وكذلك ميزات اعادة تركيب Re-structuring للبيئة المحيطة من اجل اعادة تجدد واصلاح الانسجة والخلايا التالفة .

## الاستنتاجات و التوصيات Conclusions and recommends

### الاستنتاجات Conclusions

- 1- إمكانية عزل الخلايا الجذعية اللحمية من نقي عظام الجرذان البيضاء ، وانماؤها خارج الجسم الحي باستخدام دوارق الزرع النسجي وبتقنيات يسيرة .
- 2- تمتلك الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من نقي العظم قابلية الالتصاق في قعر دوارق الزرع النسجي ، وتعد هذه احد مزايا هذه الخلايا الجذعية التي يمكن من خلالها فصل الخلايا الجذعية اللحمية عن باقي أنواع خلايا نقي العظم التي تبقى طافية في دوارق الزرع النسجي.
- 3- ظهرت الخلايا الجذعية اللحمية بشكل مغزلي شبيح بالارومات الليفية مع وجود بروزات طويلة أو قصيرة في المزارع الخلوية خارج الجسم الحي ، فضلاً عن قدرتها على تكوين تجمعات من الخلايا التي تعرف بالمستعمرات المكونة للارومات الليفية.
- 4- ان الانتان الذي تم إحداثه تجريبياً بطريقة ربط الاعور وثقبه ، سبب معدلات تفوق عالية مع تغيرات مرضي عيانية و نسجية في معظم اعضاء وانسجة الجرذان .
- 5- إن الانتان الذي تم إحداثه تجريبياً بطريقة ربط الاعور وثقبه ، سبب انخفاض في كل من العدد الكلي لكريات الدم البيض وفي الصفائح الدموية ، فضلاً عن ارتفاع في مستويات البروتين التفاعلي سي .
- 6- إن عملية حقن الخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد سبب هجرة هذه الخلايا الجذعية الى الاعضاء والانسجة المتضررة بسبب الانتان وبشكل خاص في كل من الكبد والكلية ، إذ ظهرت هذه الخلايا الجذعية على شكل خلايا شبيه بالارومات الليفية .
- 7- إن عملية حقن الخلايا الجذعية اللحمية عن طريق الوريد سبب تحسناً في كل من معدلات البقاء على قيد الحياة ، وكذلك في صورة الدم وفي مستوى البروتين التفاعلي سي ، فضلاً عن التحسن في التغيرات المرضية النسجية لكل من الكبد والرئة والكلية والقلب .

## التوصيات Recommends

- 1- اجراء المزيد من البحوث وباستخدام التقنيات البيولوجية الجزيئية Molecular Biology ، والمجهر الالكتروني في دراسة الخلايا الجذعية للحمية وتطبيقاتها العلاجية .
- 2- استخدام الصبغات المتألقة مع الخلايا الجذعية للحمية لمعرفة نسب تواجد هذه الخلايا بعد حقنها داخل الجسم الحي.
- 3- اجراء دراسة لقياس مستويات الوسيطات الالتهابية وبشكل خاص عامل نخر الورم  $TNF-\alpha$  والانتروكين IL-6 ، وتأثير الخلايا الجذعية للحمية في خفض مستويات هذه الوسيطات وتقليل الالتهاب .
- 4- اجراء دراسة حول دور الخلايا الجذعية للحمية في تقليل حالة تليف وتشمع الكبد المحدث تجريبياً في الحيوانات المختبرية
- 5- استخدام انواع اخرى من الخلايا الجذعية مثل الخلايا الجذعية المكونة للدم في علاج بعض الحالات المرضية .
- 6- عزل الخلايا الجذعية للحمية من نقي عظام الحيوانات الكبيرة مثل الخيول والابقار والاعنام او من الكلاب .
- 7- دراسة التأثيرات المضادة للجراثيم للخلايا الجذعية للحمية عن طريق استخدامها في علاج أو تقليل الحالات المرضية الناجمة عن الخمج الجرثومي
- 8- استخدام الخلايا الجذعية للحمية في حالات الكسور واعتلالات المفاصل والاربطة في كل من الخيول والكلاب .

## المصادر References

### المصادر العربية

- الجماس ، مي عطا الله محمد (2007). الطرائق ما قبل السريرية لتقييم الخلايا الجذعية لدم الحبل السري البشري . اطروحة دكتوراه ، جامعة الموصل ، كلية العلوم .
- السبعوي ، رشا عزيز محمد (2013). عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللّحمية من مصادر مختلفة من الفئران المهقاء ومحاولة لعلاج داء السكر المستحدث. اطروحة دكتوراه ، جامعة الموصل ، كلية العلوم .
- العزاوي ، انتصار نعمان وحيد (2003) . دراسة تجريبية على زراعة الخلايا الجذعية الجنينية للبانن في الاوساط الزرعية. اطروحة دكتوراه ، الجامعة المستنصرية ، كلية العلوم.
- المولى ، عامر حسين طه (2013) . عزل وتنمية الخلايا الجذعية اللحمية من نقي العظام للفأر الابيض وتمايزها الى المسار العظلي الهيكلية خارج الجسم الحي .رسالة ماجستير ، جامعة تكريت ، كلية التربية .
- بيداء ، عامر احمد (2014). دراسة تمايز الخلايا الجذعية اللحمية المعزولة من الحبل السري للإنسان ونخاع عظم الفأر الى الخلايا الشبيه بخلايا جزر لانكرهانز. اطروحة دكتوراه ، جامعة بغداد ، كلية العلوم.
- عبد الرزاق ، احمد حافظ (2000) . استحداث مزرعة لتنمية وتوصيف الخلايا الجذعية المكونة للدم المعزولة من الدم المحيطي ودم الحبل السري . اطروحة دكتوراه ، جامعة بغداد ، كلية العلوم.

## المصادر الانكليزية

- Abraham , E. and Singer M. (2007). Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. Crit. Care Med. , 35(10) :1-9.
- Abe, T. ; Masuya, M. and Ogawa, M.(2010). An efficient method for single hematopoietic stem cell engraftment in mice based on cell-cycle dormancy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* , 38(7):603-8
- Aggarwal, S. and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* ,105:1815.
- Aird , W. C. (2003). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *BLOOD*, 101(10 :1-14.).
- Aird, W. C. (2005). Sepsis and Coagulation. *Crit Care Clin.* , 21(3):417– 431.
- Akira, S. ; Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* , 124(4) : 783–801.
- Ali, H. and Al-Mulla, F. (2012). Defining umbilical cord blood stem cells. *Stem Cell Discovery* , 2 (1) : 15-23.
- Anderson, D. J. ; Gage, F. H. ; and Weissman, I. L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries. *Nature Med.* , 7(4) : 393-395.
- Andrades, M.E. ; Ritter, C. ; Dal-Pizzol, F.(2009). The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci (Elite Ed).* , 1:277–87.
- Ankrum, J. and Karp, J. M. (2010). Mesenchymal stem cell therapy:Two steps forward, one step back. *Trends in Molecular Medicine* , 16(5):203-9
- Arinzeh, T.L. ; Peter, S.J. ; Archambault, M.P. ; Bos, C. ; Gordon, S. Kraus, K. ; Smith, A. and Kadiyala, S. (2003). Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect. *J. Bone and Joint Surg.* ,85:1927-1935.

- Atmatzidis, S. ; Koutelidakis, I.M. ; Chatzimavroudis, G. ; Kotsaki, A. ; Louis, K. ; Pistiki, A. ; Savva, A. ; Antonopoulou, A. ; Atmatzidis, K. ; Giamarellos-Bourboulis, E.J.(2011). Detrimental effect of apoptosis of lymphocytes at an early time point of experimental abdominal sepsis. *BMC Infect Dis.* ,20;11:321.
- Augello, A. , Kurth, T. B. and Bari, C. D. (2010). Mesenchymal Stem Cells: A Perspective From In Vitro Cultures To In Vivo Migration and Niches. *European Cells and Materials* , 20 : 121-133.
- Avasthi, S. ; Srivastava, R. N. ; Sing, A. and Srivastava, M. (2008). Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical* , 3(1): 22-30.
- Axelrod, H. R. (1984). Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. *Dev. Biol.* , 101(1): 225–228.
- Ayala, A. ; Xu, Y. X. ; Chung, C. S. and Chaudry, I. H. (1999). Does Fas ligand or endotoxin contribute to thymic apoptosis during polymicrobial sepsis? *Shock* , 11: 211–217.
- Ayatollahi , M. ; Geramizadeh, B. ; Zakerinia, M. ; Ramzi, M. ; Yaghobi, R. ; Hadadi, P. ; Rezvani, A. R. ; Aghdai, M. ; Azarpira, N. and Karimi, H. (2012). Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell: A Source for Cell-Based Therapy. *Int. J. Org. Transplant Med.* , 3(1): 32- 38.
- Azari, O. ; Babaei, H. ; Derakhshanfar, A. ; Nematollahi-Mahani, S. ; Poursahebi, R. and Moshrefi, M. (2011). Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation. *Vet. Res. Comm.*, 35(4):211-222.
- Barichello, T. ; Fortunato, J.J. and Vitali, A.M. (2006). Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* , 34:886–9.
- Bancroft, J. and Stevens, A. (1989). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone . London 2<sup>nd</sup>.ed:662.

- Benjamin, C. F. ; Ferreira, S. H. and Cunha, F. d. Q. (2000). Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. *J Infect Dis.* , 182(1):214-23
- Bianco, P. and Robey, P. G. (2000) Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.* ,105:1663–1668.
- Bjornson, C.R. ; Rietze, R.L. and Reynolds, B.A. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283: 534–37.
- Black, L.L. ; Gaynor, J. ; Gahring, D. and Adams, C. (2007). Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: A Randomized Double-Blinded Multicenter, Controlled Trial. *Vet. Therap.* , 8(4):272-84.
- Bongso, A. and Tan, S . (2005) Human blastocyst culture and derivation of embryonic stem cell lines. *Stem Cell Rev.* , 1(2):87–98.
- Borena, B. M. ; Pawde, A. M. ; Amarpal, ; Aithal, H. P. ; Kinjavdekar, P. ; Singh, R. and Kumar, D (2009). Autologous bone marrow-derived cells for healing excisional dermal wounds of rabbits. *Vet Rc.* , 165(19): 563-8.
- Bosnakovski, D. ; Mizuno, M. ; Kim, G. ; Takagi, S. ; Okumura, M. and Fujinaga, T. (2005) Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Res.* ,319(2):243-253.
- Bourzac, C. ; Smith, L.C. ; Vincent, P. ; Beauchamp, G. ; Lavoie, J.P. and Laverty, S.(2010). Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.* , 42(6):519-27.
- Brazelton, T.R. ; Rossi, F.M. ; Keshet, G.I. and Blau, H.M.(2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* , 290: 1775–79.
- Brooke, G. ; Tong, H. ; Levesque, J.P. (2008). Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells

- derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev* , 17:929–40.
- Brouand , H. and Simmons, J. (2002). Protocol of isolation mesenchymal stem cells from bone marrow . *Cell Biol.* , 4(12):1415-1420.
  - Bryder, D. ; Rossi, D.J. and Weissman, I.L. (2006) Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* , 169:338–346.
  - Bucki, R. ; Leszczynska, K. ; Namiot, A. (2010). Cathelicidin LL-37: A multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp.* ,58:15.
  - Burkovskiy, I. ; Sardinha, J. ; Zhou, J. and Lehmann, C. (2013). Cytokine release in sepsis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* , 4: 860-865.
  - Cadirci, E. ; Halici, Z. ; Odabasoglu, F. ; Albayrak, A. ; Karakus, E. ; Unal, D. ; Atalay, F. ; Ferah, I. and Unal, B. (2011). Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. *Clin Exp Immunol.* ,166(3): 374–384.
  - Campagnoli, C. ; Roberts, I.A. ; Kumar, S. ; Bennett, P.R. ; Bellantuono, I. and Fisk, N.M.(2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood*, 98(8):2396–402.
  - Caplan, A.I.(2008). All MSCs are pericytes. *Cell Stem Cell.* 3: 229–230.
  - Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* , 9:641–50.
  - Carvalho, A.M. ; Alves, A.L.G. ; Oliveira, P.G.G. ; Alvarez, L.E.C. ; Amorim, R.L. ; Hussni, C.A. and Deffune, E. (2011). Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *J. Equine Vet. Sci.*, 31(1):26-34.

- Catacchio, I. ; Berardi, S. ; Reale, A. ; De Luisi, A. ; Racanelli, V. ; Vacca, A. ; and Ria, R. (2013). Evidence for Bone Marrow Adult Stem Cell Plasticity: Properties, Molecular Mechanisms, Negative Aspects, and Clinical Applications of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transdifferentiation. *Stem Cells International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/589139> : 1-11.
- Chamberlain, G. ; Fox, J. ; Ashton, B. (2007). Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 25:2739.
- Chang, Y. ; Hsieh, P. H. and Chao, C.C. (2009). The Efficiency of Percoll and Ficoll Density Gradient Media in the Isolation of Marrow Derived Human Mesenchymal Stem Cells with Osteogenic Potential . *Chang Gung Med J.* , 32 (3):264-274.
- Chen, J. ; Li, Y. ; Wang, L. ; Zhang, Z. ; Lu, D. ; Lu, M. and Chopp, M. (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 32: 1005-1011.
- Choi, H. ; Lee, R.H. ; Bazhanov, N. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood.* , 118:330.
- Chung, C. S. ; Wang, W. ; Chaudry, I. H. and Ayala A. (2001) Increased apoptosis in lamina propria B cells during polymicrobial sepsis is FasL but not endotoxin mediated. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280(5):812–818.
- Cicione, C. ; Muiños-López , E. ; Hermida-Gómez , T. ; Fuentes-Boquete, I. ; Díaz-Prado , S. and Blanco , F.J.(2013). Effects of Severe Hypoxia on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation Potential. *Stem Cells Int.* , Article ID 232896.
- Cinel, I. and Dellinge, R. P. (2007). Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* , 20:345–352.
- Clark, S.R. ; Ma, A.C. ; Tavener, S.A. ; McDonald, B. ; Goodarzi, Z. ; Kelly, M.M. ; Patel, K.D. ; Chakrabarti, S. ; McAvoy, E.

- ; Sinclair, G.D. ; Keys, E.M. ; Allen-Vercoe, E. ; Devinney, R. ; Doig, C.J. ; Green, F.H. ; Kubes, P.(2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Med.* 13, 463–469.
- Clarke, D.L. ; Johansson, C.B. and Wilbertz, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* , 288(5471) : 1660-1663.
  - COL, R. and Keskin , E. (2013). Effects of Platelet-activating Factor Receptor Antagonist (PAFRA) on Selected Inflammatory and Biochemical Parameters in Lipopolysaccharide-Induced Rat Endotoxemia Model. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 19 (1): 97-102.
  - Corcione, A. ; Benvenuto, F. ; Ferretti, E. ; Giunti, D. ; Cappiello, V. ; Cazzanti, F.(2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions *Blood*, 107 (1):367-372
  - Coopersmith , C.M. ; Chang , K.C. ; Swanson, P.E. ; Tinsley, K.W. ; Stromberg, P.E. ; Buchman, T.G. ; Karl, I.E. and Hotchkiss, R.S. (2002). Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit. Care Med.* , 30(1):195–201.
  - Cray, C.; Zaias, J. ; Altman, N.H. (2009). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comp Med.* 59(6):517-26.
  - Crisan, M. ; Yap. S. ; Casteilla, L. ; Chen, C.W. ; Corselli, M. ; Park, T.S.(2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* , 3: 301–313.
  - Cristofanilli, M. ; Harris, V.K. ; Zigelbaum, A. ; Goossens, A.M. ; Lu, A. ; Rosenthal, H. and Sadiq, S.A. (2011). Mesenchymal Stem Cells Enhance the Engraftment and Myelinating Ability of Allogeneic Oligodendrocyte Progenitors in Dysmyelinated Mice. *Stem Cells Dev.* , 20(12):2065-76.
  - Crisostomo, P. R. ; Wang, Y. ; Markel, T.A.(2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- $\alpha$ , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF  $\kappa$  B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* , 294:C675.

- da Silva Meirelles, L. ; Chagastelles, P.C. ; Nardi, N.B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* , 119:2204.
- De Coppi ,P. ; Bartsch ,G. J. ; Siddiqui , M. M. ; Xu , T. ; Santos, C. C. ; Perin ,L. ; Mostoslavsky , G. ; Serre , A. C. ; Snyder , E.Y. and Yoo , J, J. (2010 ). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* , 25(1):100-6.
- De Jong, H.K. ; Van der Poll, T. ; Wiersinga, W.J. (2010).The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun.* , 2(5):422-30.
- De Miguel, M.P. ; Fuentes-Julian, S. ; Alcaina, Y.(2010). Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev.* , 6: 633– 649.
- Deitch E.A. (2005). Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*, 24(1):19-23.
- DeJager, L. ; Pinheiro, I. ; Dejonckheere, E. and Libert, C. (2011). Cecal ligation and puncture:the gold standard model for polymicrobial sepsis. *Trends in Microbiology*, 19(4): 198-208.
- Dennis, J.E. and Charbord, P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 20(3):205–14.
- Dernbach, E. ; Urbich, C. ; Brandes, R.P. (2004). Antioxidative stress associated genes in circulating progenitor cells: Evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* , 104:3591.
- Docke, W. D. ; Randow, F. ; Syrbe, U. ; Krausch, D. ; Asadullah, K. ; Reinke, P. ; Volke, H. D. and Kox, W. J. (1997). Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-treatment. *Nat. Med.*, 3(6): 678–681.
- Domen, J. ; Wagers, A. and Wiessman, I. L.(2001). Bone Marrow (Hematopoietic ) Stem cells . *Stem cell Information* . [http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative\\_Medicine/Pages/2006Chapter2.aspx](http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/Pages/2006Chapter2.aspx).

- Dominici, M. ; Le Blanc, K. ; Mueller, I. ; Slaper-Cortenbach, I. ; Marini F. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* , 8:315–7.
- Dragica, S. ; Ašanin, R. ; Maličević , Z. ; and Branka V. (2004) Model of sepsis (Caecal Ligation and Puncture) in rats caused by mixed and pure bacterial cultures and changes in white blood cell counts. *Acta Veterinaria (Beograd)* . ,54.(4):281-287.
- Drury , R. A. B. and Wallington , E. A. (1980). *Carleton's histological technique* . 5 th ed. Oxford University Press , Oxford.
- Elman, J. S. ; Li, M. ; Wang, F. ; Gimble, J. M. and Parekkadan, B. (2014). A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *Journal of Inflammation* ,11(1):1-8.
- Eslaminejad , M. B. ; Rouhi , L. ; Arabnajafi , M. and Baharvand , H. (2009). Rat marrow-derived mesenchymal stem cells developed in a medium supplemented with the autologous versus bovine serum. *Cell Biol Int.* , 33(5):607-16.
- Erices, A. ; Conget, P. ; Minguell, J.J. (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109(1): 235-242.
- Evans, M. (2011). Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(10):680 – 686.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.(1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* , 292 (5819):154–156 .
- Fernandez Vallone, V.B. ; Romaniuk, M.A. ; Choi , H. ; Labovsky, V. ; Otaegui, J. and Chasseing, N.A. (2013) Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved. *Differentiation*, 85(1) :1–10.
- Ferrari, G. ; Cusella, G. ; Angelis, D. ; Coletta, M. ; Paolucci, E. ; Stornaiuolo, A. ; Cossu, G. and Mavilio, F.(1998). Muscle

- regeneration by bone marrow –derived myogenic progenitors. *Science* , 279(5356):1528 -1530.
- Filip, S. ; Mokry, J. and Pudil, R. (2005). Recent View of Stem Cell Plasticity and Stem Cell Therapy. *CASOPIS LEKARU CESKYCH*, 144(12) : 779 - 784.
  - Fischbach, G.D. and McKhann, G.M. (2001). Cell therapy for Parkinson's disease. *Engl. J. Med.* , 44(10):763-5.
  - Fortier, L.A. ; Potter, H.G. ; Rickey, E.J. ; Schnabel, L.V. ; Foo, L.F. ; Chong, L.R. ; Stokol, T. ; Cheetham, J. and Nixon, A.J. (2010). Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with micro fracture in the equine model. *J. Bone Joint Surg. Am.* , 92(10):1927-37.
  - Francesco Bifari , Luciano, P. and Mauro, K.(2010). Immunological properties of embryonic and adult stem cells. *World J. Stem Cells* , 2(3): 50-60.
  - Friedenstein, A.J. ; Chailakhyan , R.K. ; Latsinik, N.V. ; Panasyuk, A.F. and Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation*, 17(4):331–40.
  - Friedenstein, A.J. ; Chailakhjan, R. K. and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* , 3(4): 393-403.
  - Gabay, C. and Kushner, I. (1999) Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* , 340:448–454.
  - Gade, N. E. ; Pratheesh, M. D. ; Nath, A. ; Dubey, P. K. ; Amarpal, G. and Sharma ,T.(2012). Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Vet. World.* , 5(8): 499-507.
  - Galley, H. F. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* ,107(1):57-64,
  - Gao , F. ; Chiu, S.M. ; Motan, D.A. ; Zhang , Z. ; Chen, L. ; Ji, H.L. ; Tse, H.F. ; Fu, Q.L. and Lian, Q.(2016). Mesenchymal

- stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 7:e2062.
- Gattegno-Ho, D. ; Argyle, S.A. and Argyle, D.J. (2012). Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *Vet. J.* , 191(1):19-27.
  - Geroulanos , S. and Douka, E. T.(2006). Historical perspective of the word ‘sepsis’ . *Intensive Care Medicine*, 32 (12) :2077.
  - Gnechi, M. ; Danieli, P. and Cervio, E. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul. Pharmacol.* , 57(1):48-55.
  - Gnechi, M. ; He, H. ; Noiseux, N.(2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* , 20:661.
  - Gnechi, M. ; He, H. and Liang, O.D. ( 2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* , 11(4):367–368.
  - Gonzalez-Rey, E. ; Anderson, P. ; Gonzalez, M.A. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* , 58:929.
  - Granick, J. L. ; Simon, S. I. and Borjesson, D. L. (2012). Hematopoietic Stem and Progenitor Cells as Effectors in Innate Immunity. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2012/165107.
  - Griffiths, B. and Anderson, I.D.(2009). Sepsis, SIRS and MODS. *SURGERY* , 27(10):446-449.
  - Grove, J.E. , Bruscia, E. , and Krause, D. S. (2004). Plasticity of bone marrow – derived stem cell . *Stem cell* , 22(4) : 487-500.
  - Gupta, A. ; Berg, D.T. ; Gerlitz, B. ; Sharma, G.R. ; Syed, S. ; Richardson, M.A. ; Sandusky, G. ; Heuer, J.G. ; Galbreath, E.J. and Grinnell, B.W. (2007). Role of Protein C in Renal Dysfunction after Polymicrobial Sepsis. *J. Am. Soc. Nephrol.* , 18(3): 860–867.

- Gupta, N. ; Su, X. ; Popov, B.; Lee J.W. and Matthay , M. A. (2007). Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol.* , 179:1855.
- Gurudutta, G.U. ; Satija, N.K. ; Singh, V.K. ; Verma, Y.K. ; Gupta, A. and Tripathi, R.P.(2012). Stem cell therapy: a novel & futuristic treatment modality for disaster injuries. *Indian J. Med. Res.* ,135:15-25.
- Hall, S.R. ; Tsoyi, K. ; Ith, B. ; Padera, R.F. ; Jr Lederer, J.A. ; Wang, Z. ; Liu, X. and Perrella, M. A.(2013). Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils. *Stem Cells.* 31(2):397-407.
- Hiramatsu, M. ; Hotchkiss, R. S. ; Karl, I. E. and Buchman, T. G. (1997) . Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* , 7:247–253.
- Hotchkiss, R. S. ; Chang, K. C. ; Grayson, M. H. ; Tinsley, K. W. ; Dunne, B. S. ; Davis, C. G. ; Osborne, D. F. and Karl, I. E. (2003). adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 100: 6724–6729.
- Hotchkiss, R.S. ; Swanson, P.E. ; Knudson, C.M. ; Chang, K.C. ; Cobb, J.P. ; Osborne, D.F. ; Zollner, K.M. ; Buchman, T.G. ; Korsmeyer, S.J. and Karl, I.E.(1999). Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J. Immunol.*, 162: 4148–56.
- Hotchkiss, R.S. and Nicholson, D.W. (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* , 6(11): 813–822.
- Howell, J. C. and Yoder, M. C. (2003). Adult Stem Cell Plasticity. *Neo. Reviews* , 4(7) : 181-186.
- Ianus, A. ; Holz, G.G. ; Theise, N.D. and Hussain, M. A. (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells

- from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* , 111(6):843–850.
- Inoue, S. ; Unsinger, J. ; Davis, C.G. ; Muenzer, J.T. ; Ferguson, T.A. ; Chang, K. ; Osborne, D.F. ; Clark, A.T. ; Coopersmith, C.M. ; McDunn, J.E. and Hotchkiss, R .S. (2010) . IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* , 184(3):1401–1409.
  - Iyer, S.S. and Rojas, M.(2008). Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther.* , 8(5):569-81.
  - Jackson, K. ; Majka, S.M. ; Wang, H. ; Pocius, J. ; Hartley, C.J. ; Majesky, M.W. ; Entman, M.L. ; Michael, L.H. and Goodell, M.A.(2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells . *Journal of Clinical Investigation*, 107(11) : 1395–1402.
  - Javaregowda, P. K. ; Yoon, J. W. and Jang, G. (2013). Roles of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in bacterial diseases. *J. Biomed Res.* 14(4):184-194.
  - Jeong, J.H. ; Ki, Y.W. ; Kim, J.Y. ; Jan, S.H. ; Kim, S.H. and Chang, Y. (2005). Adipose Tissue Derived MSC Enhances Motor Function in Rats with Cerebral Infarction. *IFATS Oral Presentation*.
  - Ji, M.H. ; Yang, J.J. ; Wu, J. ; Li, R.Q. ; Li, G.M. and Fan, Y.X. (2012). Experimental sepsis in pigs- effects of vasopressin on renal, hepatic, and intestinal dysfunction. *Ups. J. Med. Sci.* , 117(3): 257- 63.
  - Jia , G.Q. ; Zhang , M.M. ; Yang, P. (2009). Effects of the different culture and isolation methods on the growth, proliferation and biology characteristics of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* ,40(4):719-723.
  - Jiang, Y. ; Jahagirdar, B.N. ; Reinhardt, R.L. ; Schwartz, R.F. ; Keene, C. D. ; Ortize-Gonzalez, X.R. ; Rayes, M. ; Lenvik T. ; Lund, T. ; Lisberg, A. ; Low, W.C. ; Largaespada, D.A. and Verfaillie, C.M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from bone marrow . *Nature* , 48 : 41-49.

- Jin , H. J. ; Bae , Y. K. ; Kim, M. ; Kwon , S. J. ; Jeon , H. B. ; Choi , S. J. ; Kim , S. W. ; Yang , Y. S. ; Oh , W. and Chang , J. W. (2013). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* , 14(9):17986-18001.
- Johnson, C.L. ; Soeder, Y. and Dahlke, M.H.(2017). Concise Review: Mesenchymal Stromal Cell-Based Approaches for the Treatment of Acute Respiratory Distress and Sepsis Syndromes. *Stem Cells Transl Med.* , 6(4):1141-1151.
- Jung, D. ; Ha, J. ; Kang, B.T. ; Kim, J.W. ; Quan, F.S. ; Lee, J.H. ; Woo, E.J. and Park, H.M. (2009). A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurolog. Sci.*, 285(1): 67-77.
- Karaoz, E. ; Aksoy, A. ; Ayhan, S. ; Sariboyaci, A.E. ; Kaymaz, F. and Kasap, M.(2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 132(5):533-46.
- Kaufman, D.S. (2009). Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood.* 4(17):3513-23.
- Kim, J. and Hematti, P.(2009) Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* , 37:1445.
- Kinnaird, T. ; Stabile, E. ; Burnett, M.S. (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* , 94:678.
- Kocabaş, E. ; Sarikçioğlu, A. ; Aksaray, N. ; Seydaoğlu, G. ; Seyhun, Y. ; Yaman, A.(2007). Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr.* 49(1):7-20.

- Kochar, P. G. (2004). What are stem cells .  
<http://www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php>.
- Koksai, G.M. ; Sayilgan, C. ; Aydin, S. ; Oz, H. ; Uzun, H.(2004). Correlation of plasma and tissue oxidative stresses in intra-abdominal sepsis. J Surg Res. , 122:180–3.
- Kolios, G. and Moodley, Y . (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine . Respiration. 85(1):3–10.
- Kon, E. ; Muraglia, A. ; Corsi, A. ; Bianco, P. ; Marcacci, M. ; Martin, I. ; Boyde, A. ; Ruspantini, I. ; Chistolini, P. ; Rocca, M. ; Giardino, R. ; Cancedda, R. and Quarto, R. (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. J. Biomed. Mater. Res., 49(3):328–337.
- Kopen, G.C. ; Prockop, D.J. and Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl. Acad. Sci. , 96(19):10711–6.
- Krause, D. S. ; Theise, N. D. ; Collector, M. I. ; Hengariu, O. ; Hwang, S. ; Gardner, R. ; Neutzel, S. and Sharkis, S. J. (2001).Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow–derived stem cell. Cell ,105(3):369-377.
- Krasnodembskaya, A. ; Song, Y. ; Fang, X. (2010). Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. Stem Cells ,28:2229.
- Kumar, D. ; Anand, T. ; Singh, M.K. ; Chauhan, M.S. and Manik, R. S.(2009). Characterization of embryonic stem cells : A special focus on farm animals . Indian journal of biotechnology , 8:23-32.
- Kuroda, Y. ; Kitada, M. ; Wakao, S. ; Dezawa, M.(2011). Bone Marrow Mesenchymal Cells: How Do They Contribute to Tissue Repair and Are They Really Stem Cells? Arch. Immunol. Ther. Exp. , 59:369–378.
- Larijani, B. ; Esfahani, E.N. ; Amini, P. ; Nikbin, B. ; Alimoghaddam, K. ; Amiri, S. ; Malekzadeh, R. ; Yazdi, N.M. ; Ghodsi, M. ; Dowlati, Y. ; Sahraian, M.A. and Ghavamzadeh,

- A.(2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta. Med. Iran.* ,50(2):79-96.
- LaRosa, S. P. and Opal, S. M. (2012). Immune Aspects of Sepsis and Hope for New Therapeutics. *Curr. Infect. Dis. Rep.* , 14(5):474–483.
  - Laura, C. ; Groza, I. ; Oana, L. ; Pall, E. ; Tean, C. P. ; Catana, P. and Cenariu, M. (2008). Canine mesenchymal stem cells isolation from bone marrow aspirates. *Bulletin UASVM, Vet. Med.* ,65(2):96-101.
  - Lee, H.J. ; Lee, J.K. ; Lee, H. ; Shin, J. W. ; Carter, J.E. ; Sakamoto, T. ; Jin, H.K. and Bae, J.S. (2010). The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* ,481(1):30-5.
  - Lee, H.B. ; Chung, Y.S. ; Heo, S.Y. and Kim, N.S. (2009). Augmentation of bone healing of nonunion fracture using stem cell based tissue engineering in a dog : a case report. *Vet. Med.* ,54(4):198–203.
  - Lennon , D.P. Edmison J.M. and Caplan A. I. (2001). Cultivation of *Rat* Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells *in* Reduced Oxygen Tension: Effects on *In Vitro* and *In Vivo* Osteochondrogenesis. *J Cell Physiol.* , 187(3):345-355.
  - Lennon, D.P. and Caplan, A.I.(2006). Isolation of human marrow derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* , 34:1604-1605.
  - Lerolle, N. ; Nochy, D. ; Guérot, E. ; Bruneval, P. ; Fagon, J.Y. ; Diehl, J.L. and Hill G.(2010). Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med.* ,36(3):471-8.
  - Lvesque , J.P. ; Takamatsu, Y. ; Nilsson, S.K. ; Haylock, D.N. ; Simmons, P.J.(2001). Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* , 98(5):1289–1297.

- Li, M. , and Ikehara, S.(2013). Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Organ Repair. *Stem Cells Int.* , 2013:132642. doi: 10.1155/2013/132642
- Lima, J. D. ; Skare, T. L. ; Malafaia, O. ; Ribas-Filho, J. M. ; Michaelis, T. ; Ribas, F. M. and Macedo, R. C. (2011). Sepsis Model To Induce Syndrome Of Multiple Organ Dysfunction : An Experimental Study In Rats. *Arq. Bras. Cir. Dig.* , 24(2): 95-102
- Lin, Y. ; Weisdorf, D. J. ; Solovey, A. and Hebbel, R. P. (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* , 105(1):71–77.
- Litzow, M. R. (2001). Blood and Marrow transplantation.209-227 In: Tefferi , A. "Primary hematology" . |Humana Press. Totowa , New Jersey.
- Liu, X. ; Li, X. ; Fan, Y. ; Zhang, G. ; Li, D. ; Dong, W. ; Sha, Z. ; Yu, X. ; Feng, Q. ; Cui, F. and Watari, F. (2010). Repairing goat tibia segmental bone defect using scaffold cultured with mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 94(1):44-52.
- Lobo, S.M. ; Lobo, F.R. ; Bota, D.P. ; Lopes-Ferreira, F. ; Soliman, H.M. (2003) Creactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest.* , 123: 2043–2049.
- Louis, K.S. and Siegel,A.C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: Manual and Automated methods. *Mammalian cell viability: Methods and protocols. Chapter2.* Springer Science.
- Lucarelli, G. ; Isgrò, A. ; Sodani, P. and Gaziev, J.(2012). Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. *old Spring Harb Perspect Med.* ,2(5):011825.
- Luna, LG.(1968). *Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3rd ed. The Blackstone Division, McGraw – Hill Book Company. New York.
- Lyra, A.C. ; Soares, M.B. ; Da Silva, L.F. ; Fortes, M. F. ; Silva, A.G. ; Mota, A.C. ; Oliveira, S.A. ; Braga, E. L. ; De Carvalho, W.A. ; Genser, B. ; Dos Santos, R.R. and Lyra, L. G.(2007).

- Feasibility And Safety Of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation In Patients With Advanced Chronic Liver Disease. *World J. Gastroenterol.* , 13(7):1067-73.
- Ma , A. C. and Kubes, P .(2007). Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6: 415–420.
  - Ma, S. ; Xie, N. ; Li, W. ; Yuan, B. ; Shi, Y. and Wang, Y.(2013). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* , 21(2): 1-10.
  - Mahidhara, R. and Billiar, T. (2000). Apoptosis in sepsis. *Crit. Care Med.* , 28: 105–113.
  - Mahmood, A. ; Lu, D. ; Lu, M. (2003). Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* , 53:697-702.
  - Mantovani, A. ; Cassatella, M.A. ; Costantini, C. ; Jaillon, S.(2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* , 11:519–31
  - Mao , F. ; Tu ,Q. ; Wang, L. ; Chu, F. ; Li, X. ; and Wenrong, X.(2017). Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget* , 8(23): 38008–38021.
  - Martin, D. R. ; Cox, N .R. ; Hathcock, T. L. ; Niemeyer, G.P. and Baker, H. J. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exptl. Hematol.* , 30:879-886.
  - Martin, G. R.(1981). 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.
  - Massberg, S. ; Schaerli, P. and Knezevic-Maramica, I. (2007). Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* , 131(5) : 994–1008.

- Masuya, M. ; Drake, C.J. ; Fleming, P.A. (2003) Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood*, 101:2215–2218.
- Matsukawa, A. ; Hogaboam, C.M. ; Lukacs, N.W. ; Lincoln, P.M. ; Strieter, R.M. and Kunkel, S.L. (1999) . Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J. Immunol.* , 163(11): 6148–6154.
- Matute-Bello, G. ; Frevert, C. ; Kajikawa, O. ; Skerrett, S. ; Goodman, R. and Park, D.(2001). Septic Shock and Acute Lung Injury in Rabbits with Peritonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* , 163:234-43.
- Mavrommatis, A.C. ; Theodoridis, T. ; Orfanidou, A. ; Roussos, C. ; Christopoulou- Kokkinou, V. ; Zakynthinos, S. (2000). Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med.* , 28: 451–7.
- McDonald, B. ; Urrutia, R. ; Yipp, B.G. ; Jenne, C.N. ; Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* ,12: 324–333.
- McGavin, D. M. and Zachary, J. F. (2010). *Pathologic Basis Of Veterinary Disease*. 4<sup>th</sup>. Ed. MOSBY ELSEVIER.
- Mckinney – Freeman, S. L. ; Jackson, K. A. ; Camargo, F. D. ; Ferrari, G. ; Mavilio, F. and Goodell, A. (2002). Muscle – derived haematopoietic stem cells are haematopoietic in origin . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 99(3) : 1341-1346.
- Medici, D. ; Shore, E.M. ; Lounev, V.Y. ; Kaplan, F.S. ; Kalluri, R. (2010). Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med.* , 16:1400–6.
- Mehrotra , M. ; Rosol, M. ; Ogawa, M. and Larue, A.C. (2010). Amelioration of a mouse model of osteogenesis imperfecta with hematopoietic stem cell transplantation: microcomputed tomography studies. *Experimental hematology.* , 38(7):593–602.

- Mei, S.H. ; Haitsma, J.J. ; Dos Santos, C.C. (2010). Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* , 182:1047.
- Mei, S.H. ; Haitsma, J.J. ; Slutsky, A.S. ; Liles, W.C. ; Stewart, D.J.(2009.) Murine mesenchymal stem cells improve survival in polymicrobial sepsis in mice. *International Society for Stem Cell Research. Barcelona, Spain; 2009.*
- Mei, S.H. ; McCarter, S.D. ; Deng, Y. (2007). Prevention of LPS induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med.* , 4:e269.
- Menezes, G. B. ; Amaral, S. S. ; Alvarenga, D. M. and Cara, D. C. (2008). Surgical procedures to an experimental polymicrobial sepsis : Cecal Ligation and Puncture. *Braz J Vet Pathol.* , 1(2): 77 – 80.
- Meng, W. ; Paunel-Gorgulu , A. ; Flohe, S. ; Hoffmann, A. ; Witte, I. ; Mackenzie, C. ; Baldus, S.E. ; Windolf. J. ; Logters, T.T.(2012). Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care.* , 16: R137.
- Minter , D. ; Marra , K.G. and Rubin, J.P.(2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* ,129:59-71.
- Mohamadnejad, M. ; Alimoghaddam, K. ; Mohyeddin-Bonab, M. ; Bagheri, M. ; Bashtar, M. ; Ghanaati, H. ; Baharvand, H. ; Ghavamzadeh, A. and Malekzadeh, R.(2007). Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med.* ,10(4) :459-66.
- MOK, P.L. ; Leong, C. F. and Cheong, S. K. (2013). Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. *Malaysian J. Pathol.* , 35(1) : 17 – 32
- Morikawa, S. ; Mabuchi, Y. ; Niibe, K. ; Suzuki, S. ; Nagoshi, N. (2009). Development of mesenchymal stem cells partially originate

- from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun.* , 79: 1114–9.
- Morrison, S.J. , Shah, N.M. , and Anderson, D.J.(1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology . *Cell* , 88 (3): 287-298.
  - Muenzer, J.T. ; Davis, C.G. ; Chang, K. ; Schmidt, R.E. ; Dunne, W.M. ; Coopersmith, C.M. and Hotchkiss, R.S. (2010). Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* 78(4):1582–1592.
  - Mundra ,V. ; Gerling, I.C. and Mahato, R.I.(2013).Mesenchymal stem cell-based therapy. *Mol Pharm.* , 10(1):77-89.
  - Murphy, J. M. ; Fink, D. J. ; Hunziker, E. B. and Barry, F. P. (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* , 48(12):3464- 3474.
  - Murphy, J. M. ; Moncivais, K. and Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* , 45:1016.
  - Nadri, S. ; Soleimani, M, ; Hlosseni, R. ; Massumi, M. ; Atashi, A. and Izadpanah, R. (2007). An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* , 51:723-729.
  - Nadri , S. and Soleimani , M. (2009) A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* , 4(1):102-6.
  - Namas, R. ; Zamora, R. ; An, G. ; Doyle, J. ; Dick, T.E. (2012). Sepsis: Something old, something new, and a systems view. *J. Crit. Care.* , 27(3):314-11.
  - Nandoe Tewarie, R.S. ; Hurtado, A. ; Bartels, R.H. ; Grotenhuis, A. and Oudega, M. (2009). Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* , 32(2):105-14.
  - Nauta, A.J. and Fibbe, W.E.(2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* , 110:3499.

- Nemeth, K. ; Leelahavanichkul, A. ; Yuen, P.S. ; Mayer, B. Parmelle, A. ; Doi, K .(2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* ,15(1):42-9.
- Nijnik, A. and Hancock, R.E.(2009). The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol.* ,16:41.
- Nixon, A.J. ; Dahlgren, L.A. ; Haupt, J.L. ; Yeager, A.E. ; Ward, D.L. (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses nucleated cell fractions on tendon repair in horses *Res.* , 69(7):928-37.
- Noda, H. ; Noshima, S. ; Nakazawa, H. ; Meyer, J. ; Herndon, D.N. ; Redl, H. (1994). Left ventricular dysfunction and acute lung injury induced by continuous administration of endotoxin in sheep. *Shock*, 1(4):291-8.
- Ogawa, M. (2010). Hematopoietic stem cell plasticity . *Experimenta Hematology* , 38(7):527–528.
- Orlic, D. ; Kajstura, J. ; Chimenti, S. ; Jakoniuk, I. ; Anderson, S.M. ; Li, B. ; Pickel, J. ; McKay, R. ; Nadal- Ginard, B. ; Bodine, D.M. ; Leri, A. and Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410:701-5.
- Ortiz, L.A. ; Dutreil, M. ; Fattman, C. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* , 104:11002.
- Otero-Antón, E. ; González-Quintela, A. ; López-Soto, A. ; López-Ben, S. ; Llovo, J. and Pérez, L. F.(2001). Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res.* , 33(2):77-9.
- Panno, J. (2010). *Stem cell Research Medical Applications and Ethical Controversies. An imprint of Info-base Publishing . USA.*

- Passier, R. and Mummery, C.(2003). Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc. Res.* , 58(2) : 324–335.
- Pene, F. ; Courtine, E. ; Ouaz, F. ; Zuber, B. ; Sauneuf, B. ; Sirgo, G. ; Rousseau, C. ; Toubiana, J. ; Balloy, V. ; Chignard, M. ; Mira, J.P. and Chiche, J.D. (2009). Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect. Immun.* , 77(12) :5651– 5658.
- Pera, M. F. ; Reubinoff , B. and Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 113(Pt 1): 5-10
- Peterson, B.E. ; Bowen, W.C. ; Patrene, K.D. ; Mars, W.M. ; Sullivan, A.K. ; Murase, N. ; Boggs, S. S. Greenberger, J.S. and Goff, J.P.(1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells . *Science*, 284(5417) : 1168-1170 .
- Petrie, A. and Watson, P. (1999). *Statistics for Veterinary and Animal Sciences*. Blackwell Science; Oxford.
- Pinheiro da Silva, P. and Nizet, V. (2009). Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis.* , 14( 4):509–521.
- Pittenger, M.F. Mackay, A.M. ; Beck, S.C. ; Jaiswal, R.K. and Douglas, R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* , 284 (5411):143–7.
- Plotnikov, E.Y. ; Khryapenkova, T.G. ; Vasileva, A.K. (2008). Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture.. *J Cell Mol Med.* ,12(5A): 1622-31.
- Popov, D. and Pavlov G. (2013). Sepsis models in experimental animals. *Trakia Journal of Sciences.* , 11(1):13-23 .
- Póvoa, P. (2002). C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med.* ;28(3):235-43.
- Pollard, J. and Walker, j. (1997). *Basic Cell Culture Protocols*.2<sup>nd</sup> ed. Human Press. Totowa, New Jersey .

- Priller, J. ; Persons, D.A. ; Klett, F.F. ; Kempermann, G. ; Kreutzberg, G.W. and Dirnagl, U. (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* , 155(5):733–738.
- Quevedo, H.C. ; Hatzistergos, K.E. ; Oskouei, B.N. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via tri-lineage differentiating capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 106(33):14022–14027.
- Ramachandran, G.(2014). Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence.* , 5(1):213-8.
- Rambhatla, L. ; Chiu, C.P. ; Kundu, P. ; Peng, Y. and Carpenter, M.K.(2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant.* , 12(1):1-11.
- Ratajczak, M.Z. ; Zuba-Surma, E. ; Kucia, M. ; Poniewierska, A. ; Suszynska, M. and Ratajczak, J. (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv. Med. Sci.* , 57(1): 1–17.
- Remick D. G. , Bolgos G. , Copeland S. and Siddiqui J. (2005) . Role of Interleukin-6 in Mortality from and Physiologic Response to Sepsis. *Infection And Immunity*, 73(5): 2751–2757.
- Remick, D. G. ; Newcomb, D.E. ; Bolgos, G.L. and Call, D.R. (2000) . Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* , 13(2):110-6.
- Ren, G. ; Zhao, X. ; Zhang, L. ; Zhang, J. ; L'Huillier, A. ; Ling, W. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol.* 184:2321–2328.
- Richard, S. ; Hotchkiss, R. S. ; Monneret, G. and Payen, D. (2013). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet. Infect. Dis.* , 13(3): 260–68.

- Rifai, S. (2000). Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. *J. Clin. Invest.* , 105(1):17–19.
- Ritter, C. ; Andrades, M. ; Frota, M. L. C. (2003). Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Medicine* ., 29(10):1782–1789.
- Rittirsch, D. ; Huber-Lang, M.S. ; Flierl, M.A and Ward, P.A.(2008). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* , 4(1):31-6.
- Rochefort, G.Y. ; Delorme, B. ; Lopez, A.(2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells.* 24:2202.
- Rolletschek, A.; Wiese, C. and Wobus, A. (2008). *In vitro* culture and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mech. Dev.* 56-77.
- Roobrouck, V. D. ; Ulloa-Montoya, F. and Verfaillie , C. M. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp. Cell Res.* , 314(9) : 1937 – 1944.
- Rossant, J. (2001). Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*, 19(6): 477–482.
- Russel, J.A. ; Boyd, J. ; Nakada, T. ; Thair, S. and Walley, K.R. (2011). Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol*, 17: 48-85.
- Ryu, H.H. ; Lim, J.H. ; Byeon, Y.E. ; Park, J.R. ; Seo, M.S. ; Lee, Y.W. ; Kim, W.H. ; Kang, K.S. and Kweon, O.K. (2009). Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J. Vet. Sci.*,10(4): 273-284.
- Sagar, J. ; Chaib, B. ; Sales, K. ; Winslet, M. ; Seifalian, A. (2007). Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int.* , 7(9):1-11.
- Schulte, W. ; Bernhagen, J. and Bucala, R. (2013). Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic

Targets—An Updated View. *Mediators Inflamm.* , Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/165974>.

- Seely, K.A. ; Holthoff, J.H. ; Burns, S.T. ; Wang, Z. ; Thakali, K.M. ; Gokden, N. ; Rhee, S.W. and Mayeux PR. (2011). Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology.* 301:F209–17.
- Segers, V.F. ; Van Riet, I. ; Andries, L.J.(2006). Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: Activators and mechanisms.*AmJ Physiol Heart Circ Physiol* , 290:H1370.
- Sell, S. *Stem cell Handbook* . (2004) , Human Press Inc. , TOTOWA , NEW JERSEY USA .
- Semedo, P. ; Palasio, C.G. ; Oliveira, C.D. ; Wang , P.M. ; Teixeira, V.P. ; Reis, M.A. ; Pacheco-Silva, A. and Câmara, N.O. (2009). Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *Int. Immunopharmacol.* 9(6): 677–82.
- Semple, J.W. ; Aslam, R. ; Kim, M. ; Speck, E.R. ; Freedman, J.(2007). Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood.* 109: 4803–5.
- Shamblott, M. J. ; Axelman, J. ; Wang, S.P. ; Bugg, E.M. ; Littlefield, J. W. ; Donovan, P. J. ; Blumenthal, P.D. ; Huggins, G.R. and Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* , 95(23):13726-13731.
- Si, Y. ; Tsou, C. L. ; Croft, K. and Charo, I. F. (2010). CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J. Clin Invest.* , 120(4):1192-203.
- Singleton, K. D. and Wischmeyer, P. E. (2003). Distance of Cecum Ligated Influences Mortality, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Expression following Cecal Ligation and Puncture in the Rat. *Eur Surg Res.* , 35(6):486–491.

- Slukvin, I. and Vodyanik, M. (2011). Endothelial origin of mesenchymal stem cells. *Cell Cycle* , 10(9):1370–3.
- Smajilagic , A. k Aljičević , M. ; Redžić, A. ; Lagumdžija, A. C. (2013). Rat bone marrow stem cells isolation and culture as a bone formative experimental system. *Bosn J Basic Med Sci.* , 13(1): 27-30.
- Smith, R.K. ; Korada, M. ; Blunn, G.W. and Goodship, A.E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.*, 35(1):99-102.
- Smith, T.L. and Weyrich, A.S. (2011). Platelets as central mediators of systemic inflammatory responses. *Thromb Res.* , 127(5):391-4.
- Spaggiari , G.M. ; Capobianco, A. ; Becchetti, S. ; Mingari, M.C. and Moretta, L.(2006). Mesenchymal stem cell natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK cell proliferation. *Blood* ,107(4):1484-90.
- Soleimani , M. and Nadri , S. (2009). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* , 4(1):102-6.
- Song, J. ; Hu, D. ; He, C. ; Wang, T. Liu, X. ; Ma, L. ; Lin, Z. and Chen, Z. (2013). Novel biomarkers for early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in a mouse cecal ligation and puncture model. *J. Inflamm.*, 10(7):1-10
- Song, R. ; Kim, J. ; Yu, D. ; Park, C. and Park, J. (2012). Kinetics of IL-6 and TNF changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* , 146(2):143-9.
- Soriano, A.O. ; Jy, W. ; Chirinos, J.A. ; Valdivia, M.A. ; Velasquez, H.S. ; Jimenez, J.J. ; Horstman, L.L. ; Kett, D.H. ; Schein, R.M. ; Ahn, Y.S. (2005). Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* , 33:2540-2546.

- Souza Neto, J.L. ; Araújo Filho, I. ; Rego, A.C. ; Dominici, V.A. ; Azevedo, I.M. ; Egito, E.S. ; Brandão-Neto, J. and Medeiros, A.C.(2006). Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cir Bras.* , 4:8-12.
- Spaggiari, G.M. ; Abdelrazik, H. ; Becchetti, F.(2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood.* ,113:6576.
- Strasser, A. ; O'Connor, L. ; Dixit, V. M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu.Rev. Biochem.* 69, 217–245.
- Szalai, A.J. ; Briles, D.E. ; Volanakis, J.(1995). Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J Immunol.* , 155:2557–2563.
- Szalai, A.J. ; Van Cott, J.L. ; McGhee, J.R. ; Volanakis, J.E. ; Benjamin, W.H. (2000) . Human C-reactive protein is protective against fatal *Salmonella enterica serovar typhimurium* infection in transgenic mice. *Infect Immun.* , 68:5652–5656.
- Takashima, Y. ; Era, T. ; Nakao, K. ; Kondo, S. ; Kasuga, M. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129(7):1377–88.
- Tanaka, F. ; Tominaga, K. ; Ochi, M. (2008). Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci.* , 83:771.
- Tang, J. ; Wang, J. ; Kong, X. (2009). Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway. *Exp Cell Res.* , 315:3521.
- Tapfer, H. ; Liigant, A. ; Simovart, H.E. ; Põldoja, E. ; Kokk, K. ; Naaber, P. ; Talvik, R.(2003). Dissemination of bacteria in multiple organs associated with apoptosis and macrophage activity in different stages of experimental sepsis. *Scand J Surg.* 92(2):163-70.

- Tarnowski, M. and Sieron, A. L. (2006) . Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med. Sci. Monit.* , 12(8): 154-163.
- Tatsumi, K. ; Otani, H. ; Sato, D. (2008). Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J.* 72:1351.
- Terai, S. ; Ishikawa , T. ; Omori, K. ; Aoyama, K. ; Marumoto, Y. ; Urata, Y. ; Yokoyama, Y. ; Uchida, K. ; Yamasaki, T. ; Okita, K. ; Sakaida, I.(2006). Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* , 24(10):2292-8.
- Theise, N.D. ; Badve, S. ; Saxena, R. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*, 31(1):235–240.
- Thomson, J.A. ; Itskovitzeldor, J. ; Shapiro, S.S. ; Waknitz, M. A. ; Swiergiel, J.J. ; Marshall, V.S. and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* , 282(5391):1145-1147.
- Till, J. and McCulloch, E. A.( 1961). direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* , 14: 213-224.
- Togel, F. ; Hu, Z.M. ; Weiss, K. ; Isaac, J. ; Lange, C. and Westenfelder, C.(2005). Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289(1): F31–F42.
- Torrisi, C. P. (2007). Embryonic vs. Adult: The History and Future of the Stem Cell Debate. *Journal of Health & Biomedical Law*, 111 (1): 143-162.
- Toscano, M.G. ; Ganea, D. and Gamero, A. M. (2011). Cecal ligation puncture procedure. *J. Vis. Exp.*, 7(51) : 2860.
- Treacher, D. F and Brown, K A. (2009). The basic science of sepsis *SURGERY*, 27(11): 465-469.

- Trivanović , D. ; Kocić , J. ; Mojsilović , S. ; Krstić , A. ; Ilić , V. ; Djordjević , I.O. ; Santibanez , J.F. ; Jovčić , G. ; Terzić , M. ; Bugarski , D. (2013). Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek.* , 141(3-4):178-86.
- Van der Poll, T. and Opal, S. M.(2008). Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* , 8(1):32–43.
- Vandervelde, S. ; van Luyn, M.J. ; Tio, R.A. (2005). Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* ,39:363.
- Vandivier, R. W. ; Fadok, V. A. ; Ogden, C. A. ; Hoffmann, P. R. ; Brain, J. D. ; Accurso, F. J. ; Fisher, J. H. ; Greene, K. E. ; Henson, P. M. (2002). Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways. *Chest* 121, 89S.
- Van Veen, S.Q. ; Levi M. ; Van Vliet, A.K. ; Florquin, S. ; Van Gulik, T.M. and Boermeester, MA. (2006) Peritoneal lavage with activated protein C alters compartmentalized coagulation and fibrinolysis and improves survival in polymicrobial peritonitis. *Crit. Care Med.* , 34(11):2799–2805.
- Vassilopoulos, G. ; Wang, P.R. and Russell, D. W. (2003) Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* , 422 (6934):901–904.
- Venkataramana, N.K. ; Kumar, S.K. ; Balaraju, S. ; Radhakrishnan, R.C. ; Bansal, A. ; Dixit, A. ; Rao, D.K. ; Das, M. ; Jan, M. ; Gupta, P.K. ; Totey, S.M.(2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res.* ,155(2):62-70.
- Yagi, H. ; Soto-Gutierrez, A. ; Kitagawa, Y. (2010). Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant.* , 19:823.
- Wagers A. J. and Weissman I. L. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell.* 116(5): 639–648.

- Waheed, I.N. ; Mnati, I.M. and Kadhim, A.H. (2010). In vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells to Muscle like Cells after Treatment with Muscle Extract. Jordan Journal of Biological Sciences, 4(3): 177- 184
- Waheed, I.N. ; Ibrahim, D.R. and Mohammed, Ameen A.A. (2011). Neural Cell Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood: In Vitro. Raf. J. Sci. ,22(4): 26-38.
- Wannemuehler, T.j. ; Manukyan, M. C. ; Brewster, B.D. ; Rouch,J. ; Poynter, J.A. and Meldrum, D.R.(2012). Advances in Mesenchymal Stem Cell Research in Sepsis. Journal of Surgical Research 173, 113–126.
- Wang, H.E. ; Shapiro, N.I. ; Safford, M.M. ; Griffin, R. ; Judd, S. ; Rodgers, J.B. ; Warnock, D.G. ; Cushman, M. and Howard, G.(2013). High-sensitivity C-reactive protein and risk of sepsis. PLoS One. 8(7).
- Wang M. ; Crisostomo P.R. ; Herring C. (2006). Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 291:R880.
- Wang , R. ; Yu , B. ; Zhang , W. ; Yang , J. and Zhang , T.(2012). Effect of different concentrations of fetal calf serum on the *in vitro* culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Translational Andrology and Urology , 1(1): 2223-469.
- Wang, Y. ; Wang, M. ; Abarbanell, A.M. (2009). MEK mediates the novel cross talk between TNFR2 and TGF-EGFR in enhancing vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human mesenchymal stem cells. Surgery ,146:198.
- Ward, P.A. (2008) Sepsis, apoptosis and complement. Biochem Pharmacol. ,76(11):1383-8.

- Wise , A.F. and Ricardo, S.D.(2012). Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair. *Nephrology (Carlton)* , 17(1):1-10.
- Waynfooth , H. B. (1980). Experimental and surgical technique in the Rat. Academic Press Inc. (London).
- Wei, G. ; Schubiger, G. ; Harder, F. and Muller, A.M. (2000).Stem cell plasticity in mammals and trans determination in drosophila : common themes . *Stem cells*, 18(6): 409- 414.
- Wei, Y. ; Shan, L. ; Qiao, L. ; Liu, R. ; Hu, Z and Zhang, W. (2013). Protective Effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang against Polymicrobial Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* , Hindawi Publishing Corporation. Article ID 909624, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/909624>.
- Weil, B.R. ; Markel, T.A. ; Herrmann, J.L. ; Abarbanell, A.M. ; Kelly, M.L. ; Meldrum, D.R.(2009). Stem cells in sepsis. *Ann. Surg.* , 250(1):19-27.
- Wesche-Soldato, D.E ; Lomas-Neira, J.L. ; Perl, M. ; Chung, C.S. and Ayala, A. (2005). Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J. Leukoc Biol.* , 78(2):325-37.
- Wesche-Soldato, D.E. ; Swan, R.Z. ; Chung, C.S. and Ayala, A.(2007). The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr. Drug Targets* , 8(4): 493–500.
- Wichterman, K.A. ; Baue, A.E. and Chaudry, I.H.(1980). Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* , 29(2):189-201.
- Williams, A.R. and Hare, J.M. (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* , 109(8):923–40.
- Williams, J.T. ; Southerland, S.S. ; Souza, J. ; Calcutt, A.F. and Cartledge, R.G.(1999). Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. [\*Am Surg.\*](#) , 65(1):22-6.

- Wright, D.E. ; Wagers, A.J. ; Gulati, A.P. ; Johnson, F.L. ; Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* , 294(5548):1933-6.
- Wu, Y. ; Chen, L. ; Scott, P.G. and Tredget, E.E. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 25(10):2648-2659.
- Xiao, H. ; Siddiqui, J. and Daniel G. Remick(2006). Mechanisms of Mortality in Early and Late Sepsis. *Infect. Immun.* 2006, 74(9): 5227–5235.
- Xuan, A.G. ; Luo, M. ; Ji, W.D. and Long, D.H. (2009). Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer's disease rats. *Neuro. Sci. Lett.* 450(2):167-71.
- Xu, J. ; Woods, C.R. ; Mora, A.L. ; Joodi, R. ; Brigham, K.L. ; Iyer, S. (2007). Prevention of endotoxin induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* , 293:L131.
- Yagi, H. ; Soto-Gutierrez, A. ; Kitagawa, Y.(2010). Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant.* ,19:823.
- Zanotti-Cavazzoni, S.L. and Goldfarb, R.D. (2009). Animal Models of Sepsis. *Crit Care Clin.* , 25(4):703-19.
- Zeerleder, S. ; Hack, C.E. and Wuillemin, W.A.(2005). Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest.* , 128(4):2864–2875.
- Zhang , L. and Chan, C. (2010) . Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. *J Vis Exp.* , 22(37):1852.
- Zhang, X. ; Hirai, M. ; Cantero, S. ; Ciubotariu , R. ; Dobrila, L. ; Hirsh, A. ; Igura, K. ; Satoh, H. ; Yokomi, I. ;Nishimura, T.(2011) . Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood : Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate

- to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.* , 112, 1206–1218.
- Zhao, L. ; Feng, Z.H. ; Jiao, S.X. and Li, N. (2011). Culture condition and biological characteristics of rat bone marrow mesenchymal stem cells by using the whole bone marrow adherence method. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* , 15(32): 5923-5927
  - Zhao, R. C. (2013). *Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation*. Springer Science. New York .USA.
  - Zhao , Q. ; Ren , H. and Han , Z. (2016). Mesenchymal stem cells : Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J. of cellular immunotherapy* , 2: 3-20.
  - Zhu, H. ; Guo, Z.K. ; Jiang , X.X. ; Li, H. ; Wang, X.Y. ; Yao, H. Y. ; Zhang, Y. and Mao, N. (2010).A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Na Protoc.* , 5(3):550-60.
  - Zisa, D. ; Shabbir, A. ; Suzuki, G. (2009). Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun.* , 390:834.9
  - Zuk, P.A. ; Zhu, M. ; Mizuno, H. ; Huang, J. ; Futrell, J.W. ; Katz, A.J. ; Benhaim, P. ; Lorenz, H.P. and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* , 7(2):211–28.

## Abstract

In This study , Isolation of Mesenchymal stem cells(MSCs) has been achieved from rats bone marrow , with possibility of enhanced their proliferation *in vitro* by using the classical method , which depending on the adhering capability of MSCs in tissue culture flasks , and using " DMEM" medium supplemented with fetal bovine serum and in culture conditions at 37C° with 5% CO<sub>2</sub> .

In the early stages of initial culture , two special types of cells populations had been distinguished , the adherent cells in tissue culture flasks , The MSCs and the floating cells , which are the hematopoietic stem cells and other types of bone marrow cells , which are disposed of during the continues changing of the culture media for feeding of MSCs.

The isolated MSCs are characterized by a spindle like fibroblast shape , and have uni- or bipolar cytoplasmic projections , with the ability to aggregated and form colonies called "Colony forming units derived fibroblast cells" . The phenotypic properties of MSCs were studied by using the inverted microscope .

The poly microbial Sepsis , has been conducted in rats experimentally by using a surgical model called Cecal Ligation and Puncture (CLP) . The results of this study showed decrease in the survival rate in rats to (65%) after 24h. after induction of sepsis , and the decrease in survival rates continues to reach (0%) after 7 days after induction of sepsis . Also , results showed severe leukopenia , lymphopenia and thrombopenia in septic rats , with increase in the C- reactive proteins levels .

Pathological lesions were seen in lung , liver , kidney , heart and intestine , included severe congestion of blood vessels , which contain thrombus , severe necrosis in these tissues with severe infiltration of inflammatory cells , and present of bacterial colonies .

Intravenous (I/v) injection of MSCs to septic rats , showed improvement in the survival rates up to (90%) after 24h. , also there were improvement in the blood picture and in the levels of the C- reactive proteins of septic rats injected with MSCs.

Histopathological examination showed improvement in the injured tissues through decrease in the necrosis and infiltration of the inflammatory cells , with marked infiltration of fibroblast like MSCs around the blood vessels and in tissue parenchyma , especially in the liver and in the kidney .

**the role of Stem cells in the repair of the  
pathological changes of sepsis induced  
experimentally in rats**

A Thesis Submitted  
by

**Ahmed Mohammad Ali Al-Saidya**

To  
The Council of the College of Veterinary Medicine  
University of Mosul  
In  
Partial Fulfillment of the Requirements  
For the Degree of Doctor of Philosophy  
In

Veterinary Pathology /Veterinary Medicine

Supervised by

Assist. Prof.

**Dr.Hanaa Khaleel Ismail Hamody**

University of Mosul  
College of Veterinary Medicine



**the role of Stem cells in the repair of the  
pathological changes of sepsis induced  
experimentally in rats**

**Ahmed Mohammad Ali Al-Saidya**

Ph.D/Thesis

Veterinary Pathology/ Veterinary Medicine

Supervised by

Assist. Prof.

**Dr.Hanaa Khaleel Ismail Hamody**

---

2014 A.D

1435 A.H.