مساهمة تجريبية لدراسة التمايز العصبي للخلايا الجذعية الجنينية الفأرية: Sox1 (46C) في الزجاج *In Vitro*

أميرة أومري

قسم البيولوجيا الحيوانية – كلية العلوم – جامعة دمشق – دمشق

الملخص

استنبتت الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية cell Lines Sox1 – GFP (46C cell line) فـي وسط الاستنبات الخاص GMEM مضافاً إليه العامل المثبط للتمايز LIF، وذلك ضمن أطباق استنبات خاصة بعد طليها بجيلاتين بقري بنسبة 0.1% وحفظت في حاضنة incubator في درجـة حـرارة 36.7 – 36.9ْم و4.2 – 4.9% Co2

احتفظت تلك الخلايا على عدم تمايزها بوجود العامل LIF، كما احتفظت بجودتها بشكل سليم وصحي وبالتالي تضاعفت بشكل جيد مما استدعى تعرضها لعملية التشطر splitting .

ثم عرضت هذه الخلايا إلى عملية التمايز العصبي ضمن وسط تمايز الخلايا الجذعية الجنينية أحادي الطبقة الخاص وهو N2 B27، و تبين بأن Sox1-GFP هو كاشف أو مخبر reporter نوعي عصبي، وهو جيد لعزل وتوصيف الخلايا الجذعية العصبية.

يبدأ تمايز خلايا 46C في اليوم الأول وفي اليوم ما بين الرابع والسابع يكون تعبير SOX1 بنسبة 60%– 80 % ومن ثم يبدأ بالانخفاض.

الكلمات المفتاحية:

الخلايا الجذعية الجنينية، سليفات الخلايا العصبية، التمايز الخلوي، عوامل الانتساخ، Sox1- GFP .

مساهمة تجريبية لدراسة التمايز العصبي للخلايا الجذعية الجنينية الفأرية: Sox1 (46C) في الزجاج *In Vitro*

أميرة أومري

قسم البيولوجيا الحيوانية ـ كلية العلوم ـ جامعة دمشق ـ دمشق

المقدمة:

تعد الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية mouse Embryonic stem cells، قادرة على إنتاج كل أنماط الخلايا سواءً أكانت جنينية Fetal أو بالغة Adult (Ying, Q . et al… 2003)، وبفعل أنهـا خطوط الخلايا عديدة المقدرة Pluripotent cell Lines التشكلية غير المتمايزة المستمدة من الكتلـة الخلوية الداخلية للحويصل الأصل (الكيسة الأريمية) blastocyst ، فإنها تمتلك ميزة مهمة هي قدرتها على التجدد الـذاتي Self – renew (Boheler, K. et al… 2002) (Kim, M. et al… 2009) وهي ذات صيغة صبغية مضاعفة ثابتة Stable Diploid Karyotype، وتمتلك كذلك علـى قابليـة المشاركة الكاملة في التنامي الجنيني عند إعادة إدخالها داخل الحويصل الأصل، وكذلك مقدرتها علـى التمايز إلى عدة أنماط خلوية في الزجاج *in vitro* (Stavridis , M. P., and smith , A.G. 2003).

وبالتالي أصبح هدف العلماء الباحثين الأساسي هو توجيه تمايز الخلايا الجذعية الجنينيـة إلـى أنماط خلوية ذات الصلة سريرياً (Wichterle, H. and peljto , M. 2008).

حيث تم من خلال هذين الباحثين أي Peljto وWichterle، تحوّل الخلايا الجذعيـة الجنينيـة للفأر إلى نمط محدد من الخلايا العصبية، هي الخلايا العصبية الحركيـة الـشوكية Spinal motor neurons ، ويرى علماء آخرون، بأنه من الواجب تسخير تمايز الخلايا الجذعية الجنينية لإنتاج خلايا مناسبة للعلاج في شتى الظروف، والتخلص أيضاً من الخلايا غير المرغوب فيها، وإيجـاد ظـروف مثلى لنجاح دمج الطعم ودوام بقائه حياً (stavridis, M.p., and smith , A.G. 2003).

إن عامل الإنتساخ Sox1 هو أقـرب واسـم نـوعي لخلايـا الأدمـة الخارجيـة العـصبية Neuroectoderm في جنين الفأر (Ying, Q . et al … 2003)، وبذلك فهو واسم نوعي لـسليفات الخلايا العصبية لدى الثدييات (Aubert, j. et al … 2003). ويبدي تعبيـر Sox1 بـالتزامن مـع تحريض الأدمة الخارجية العصبية، لذلك الـ Sox1 له دور في التحديد العصبي والتمـايز (pvny, L.H. et al … 1998)، بمعنى أن Sox1 هو أول تعبير في الصفيحة العـصبية Neural Plate، وأقل تنظيم خلال التمايز العصبي والتمايز الدبقي (Ying, Q . et al … 2003).

كشفت تعبيرية جين Sox1 في الأدمة الخارجية المشكلة للميزابة العصبية في مرحلة الانثنـاء الرأسي head fold وأثناء تشكل القطع الظهرية المبكر، وتعبر جينات الـ Sox1 والـ Sox2 والـ Sox3 في الأدمة الخارجية العصبية neuroectoderm (Wood, HB et al… 1999) و يـساهم هذا التعبير بدوره في تكوّن الجملة العصبية المركزية (Pevny, L.H. et al…. 1998).

تبين بأن تعبير مسار المصير العصبي للخلايا الجذعية الجنينية في الزجـاج *in vitro* يحـدث بشكل أسرع مما هو عليه في الجسم الحي *in vivo* خلال التنامي متضمناً نفس الطراز خلال تمـايز الخلايا الجذعية الجنينية (Parmar,M.,andLi,M.,2007).

يهدف هذا البحث إلى دراسة تمايز الخلايا الجذعية الجنينية ــ سليفات الخلايا العصبية- (46C cell line) إلى الخلايا العصبية والخلايـــــا الدبقية في الزجاج *in vitro*.

مواد البحث وطرائقه

خطوط الخلايا Cells Lines المستخدمة في التجارب:

استخدمت خطوط الخلايا الجذعية الجنينيـة الفأريـة mouse Embryonic Stem (mES) Cells في التجارب التي أجريت في مختبر الخلايا الجذعية ـ مدرسة العلـوم الطبيـة ـ جامعـة إيبردين ـ اسكوتلندا Cell Lines : Sox1 – GFPm Es (46C Cell Line) .

حيث تم تولد الخلايا الجذعية الجنينية 46C ES cells بوساطة استهداف الجين فـي الخلايـا الجذعية الجنينية E14 Tg2a . IV ES Cells (Ying, Q . et al … 2003)

الاستنبات الخلوي Celle Culture :

استنبتت الخلايا الجذعية الجنينية 46C ES cells، مأخوذة من جنين الفأر في مرحلة الحويصل الأصل (الكيسة الأريمية) blastocyst في أطباق بتري خاصة، مطلية بجيلاتين بقري بنسبة (Sigma %0.1 Cat G 9391) مع الوسط GMEM medium (Gilbco 21710 أو مع الوسط DMEM / F12 Medium (Gibco 31331) (يفضل استخدام وسط GMEM لأجل الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية SOX1 – GFP بينما يفضل استخدام الوسط DMEM لأجل الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية .(OCT4 – GFP.

يضاف إلى الوسط المذكور العامل المثبط اللوكيمي:

Leukemia inhibiting factor (LIF)

وهو العامل المثبط لتمايز هذه الخلايا، وذلك بغية الحصول عليها باستمرار فـي تلـك الحالـة اللاتمايزية.

وتم تغيير الوسط بشكل يومي، وحفظ أطباق الاستنبات داخل الحاضـنة Incubator بدرجـة حرارة 36.7 – 36.9° م و4.2 – 4.9% CO_2.

وعند الحصول على كمية وافرة من الخلايا الجذعية الجنينية في كل طبـق اسـتنبات- وهـذا يحصل تقريباً بعد يومين من بداية استنباتها وعزلها باخضاعها للتثقيل بجهاز الطرد المركـزي (200 دورة/5 دقائق)، وبالتشطر Splitting، يتم توزيع محتويات كل طبق مستنبت فيه الخلايـا الجذعيـة الجنينية Sox1 بغزارة إلى أربعة أطباق (1:4) ضمن الوسط المذكور أعلاه مع العامل LIF وتـرقم تلك الأطباق حسب عدد مرات التشطر وتحفظ مرة أخرى في الحاضنة وهكذا دواليك.

ويجب أن لا يتجاوز عدد مرات مرورها أكثر من 50 مرة (أي عدد مـرات التـشطر) منعـاً لحدوث أي شواذ في النمط النووي Karyotype (Wiles , M.,and Jonsson,B.,1999)

ولكي يبقى لدينا احتياطي دائم من تلك الخلايا الجذعية الجنينية، نلجأ إلى عملية تجميــدها فـــي السائل النتروجيني بعد إضافة وسط التجميد.

Free zing medium (80% Serum / 20% DMSO (Sigma cat. D2650)

وعند الحاجة لها نلجأ إلى عملية تذويبها ليتم استنباتها من جديد.

وسط تمايز الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية Sox1 – GFP (46C) أحادي الطبقة Monolayer differentiation:

تم استخدام وسط خاص للخلايا الجذعية الجنينية الفأرية غير المتمايزة، وحتماً دون اللجوء إلى إضافة LIF وذلك بعد طلي أطباق الاستنبات بـــ 0.1 % جيلاتين بقري وبمعدل كثافة خلوية

(ying, Q.et al… 2003) 0.5-1.5 × 10^4 cells / cm^2

وبوسط N2B27 medium.

يتكون الوسط N2B27 من وسط A و B بنسبة 1:1 على النحو التالي:

A: DMEM / F/2 مع

-NEAA (Nonessential amino acid) 1: 100

- 2- Mercaptoethanol 5 µl in 500 ml

- N2 Suplement 1: 100

B: Neurobasal medium مع

- B27…. 1: 50

ويتم تغيير هذا الوسط كل يومين، ولأجل تمايز المستنبتات، تم استخدام

Fluorescen ce – activated cell Sorting (FACS)

تسمح هذه التقانة بتوضيح فعالية التحول العصبي للخلايا الجذعية الجنينية

(Ying, Q.et al…. 2003) (46C cells) Sox1- GFP

استخدمت الأجهزة الآتية:

ــ حمام مائي موديل Grant28 بدرجة حرارة 36.5 -37 ْم .

ــ مجهر موديل Leica DMIL مع CCD كاميرا رقمية DFC42C موصول بحاسوب موديل DELL ومجهز بجهاز الفلورة الخضراء.

ــ جهاز الطرد المركزي موديل

ELECTRON CORPORATION CENTRIFUGE PK110 CENTRIFUG MODEL THRMO

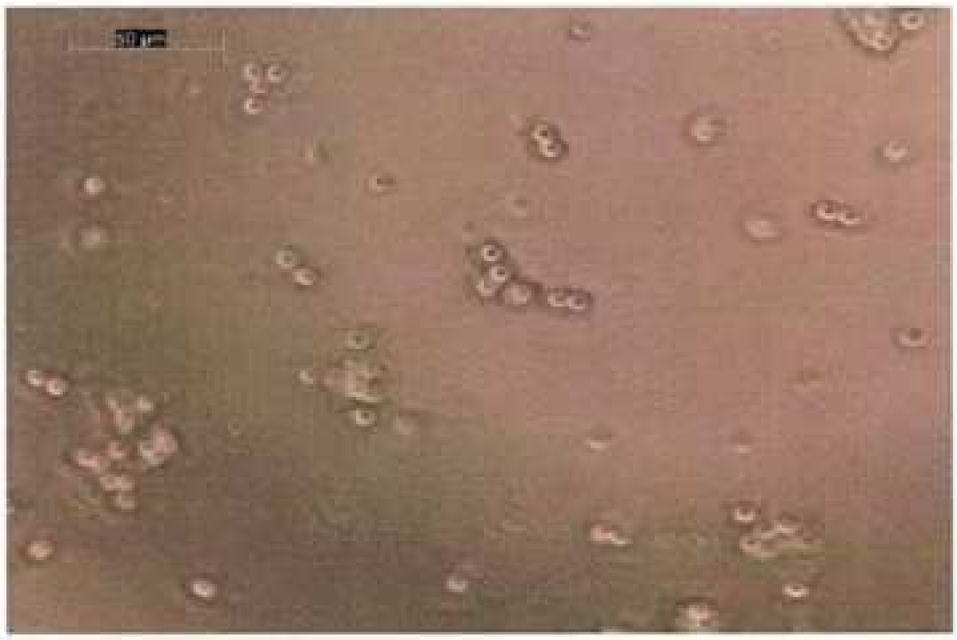
ــ خيمة الاستنبات الخاصة بالخلايا الجذعية الجنينية موديل

LAMINAR HOOD , TRIMAT2 CLASSII Microbillogical Complies with BS 5726 – 1992.

النتائج

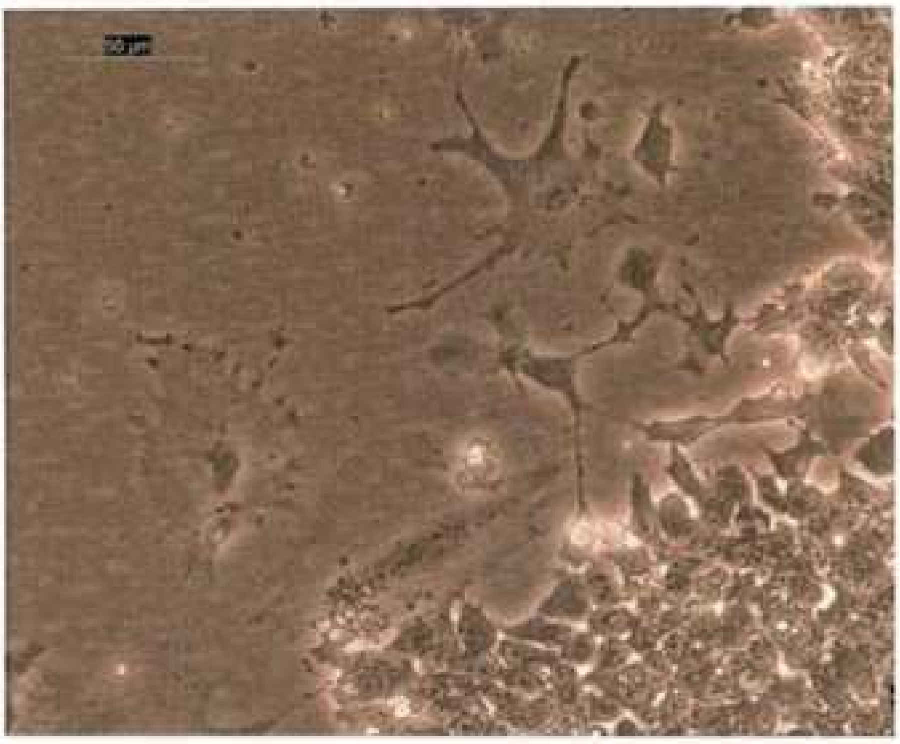
للحصول على الخلايا الجذعية الجنينية مستتبتة باستمرار وبصورة سليمة وصحية، يحتاج إلى دقة متناهية في التعامل معها، لكي لا يحصل أي تلوث تؤدي إلى فنائها، وكما يحتاج أيضاً إلى جهد متواصل ودوام يومي في المختبر بعد تعقيم كل شيء في المختبر قبل بداية التجارب وبعد الانتهاء منها.

توضح الصور في الشكل(1) ، مظهر الخلايا الجذعية الجنينية Sox1 (46C)، بعد إذابتها من التجميد بالسائل النتروجيني وتعريضها لعملية الطرد المركزي، ومن ثم وضعها داخل أطباق الاستنبات الخاصة مع الوسط GMEM وإضافة العامل المثبط لتمايزها LIF، ومن ثم قبل عملية التشطر Splitting وكذلك بعدها.

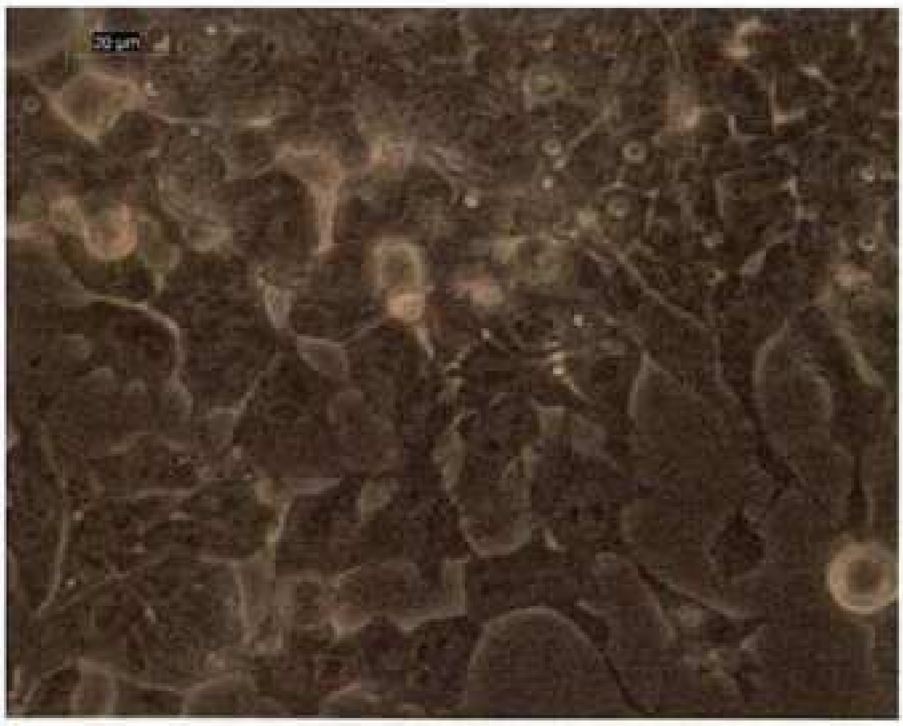


46c P30 X200 [أ]

46c P30 X100 [ب]



46c P30 x200 [ج]



46c p31 X400 [د]

شكل رقم (1) ـ صور نموذجية للخلايا الجذعية الجنينية 46C في وسط GMEM + LIF والتي تظهر بأن العامل LIF يثبط من تمايزها، و بطلي أطباق الاستنبات الخاصة بجيلاتين بقري، تحافظ على جودة الخلايا الجذعية الجنينية بشكل سليم وصحي (الصور من عمل الباحث).

[أ] – مباشرة بعد عملية التذويب Thawing للخلايا الجذعية الجنينية من السائل النتروجيني وتعريضها لعملية الطرد المركزي، ومن ثم استنباتها داخل طبق خاص يحتوي على الوسط

LIF + GMEM، يلاحظ أن الخلايا تأخذ أشكالاً حبيبية كبيرة، مكورة وطافية، وتكون متجمعة أو فرادى.

[ب] – الخلايا الجذعية الجنينية كما تظهر بعد 3 – 4 ساعات من عملية استنباتها.

و قد التصقت وامتدت بقاع طبق المستنبت ، بينما بقيت بعض الخلايا الأخرى مكورة وطافية.

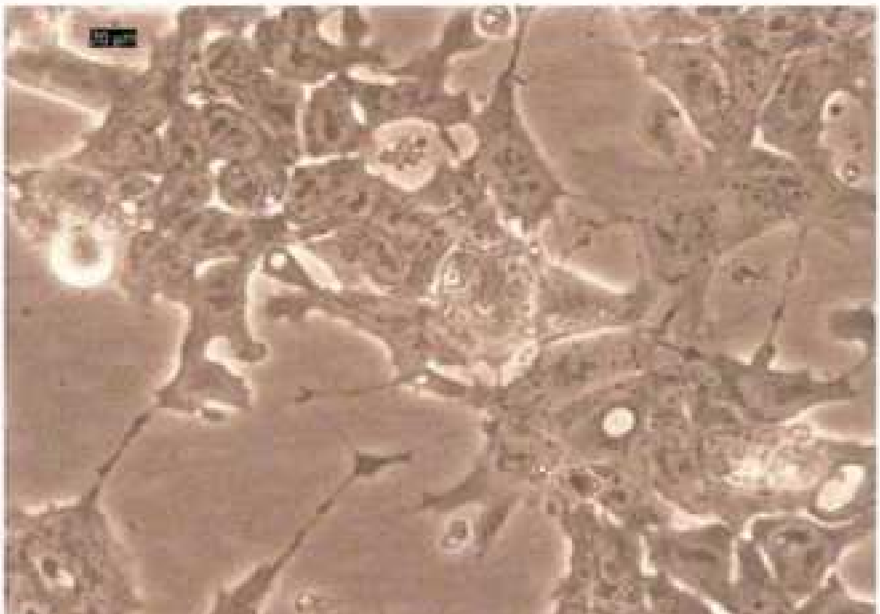
[ج] – الخلايا الجذعية الجنينية بعد ≈ 24 / ساعة من عملية استنباتها، وتبدو تقريباً بأنها قد التـصقت بقاع طبق الاستنبات وتضاعفت، وتعد أيضاً قبل عملية التشطر Splitting التالية .

[د] – الخلايا الجذعية الجنينية بعد عملية التشطر Splitting بـ 36 / ساعة، ويلاحـظ بأنهـا قـد استقرت بقاع طبق الاستنبات وتضاعفت .

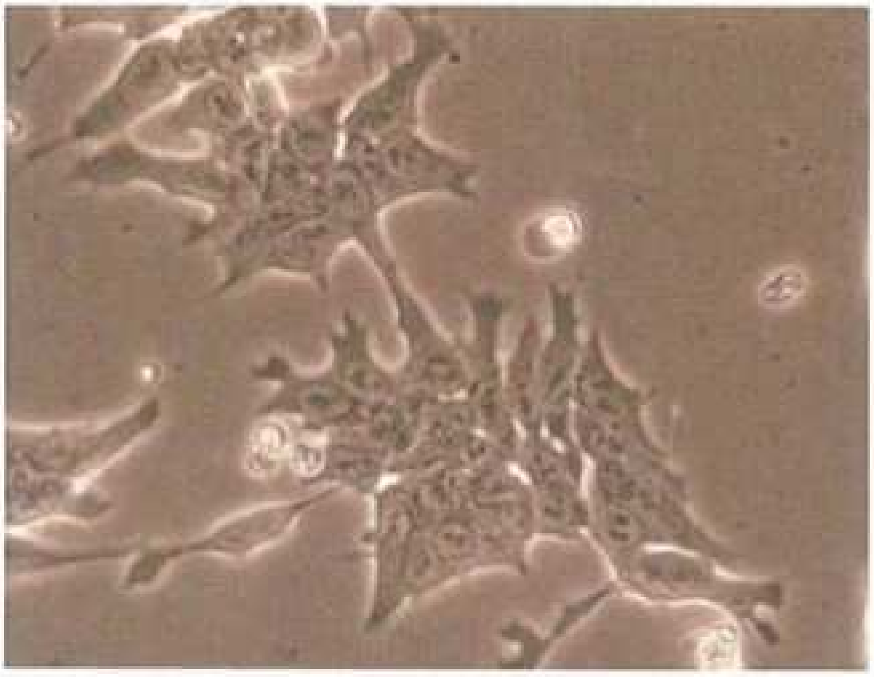
وعندما يزداد تضاعفها وتزاحم بعضها البعض، تحتاج إلى عملية تشطر أخرى، ويرمز لعدد مـرات التشطر بالحرف P

أما بالنسبة لعملية تمايز الخلايا الجذعية الجنينية في طبق الاستنبات الخاصة فتمت

بوجود وسط التمايز N2B27، وتوضح الصور في الشكل(2) عمليـة الانتقـال أو التحـول العصبي لتلك الخلايا .

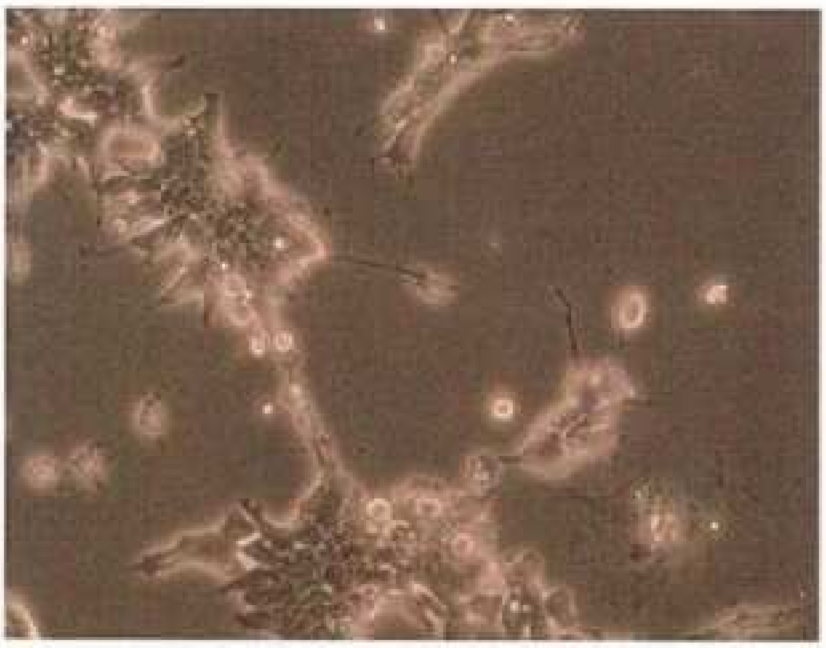


46c x400 / d = 0 [أ]



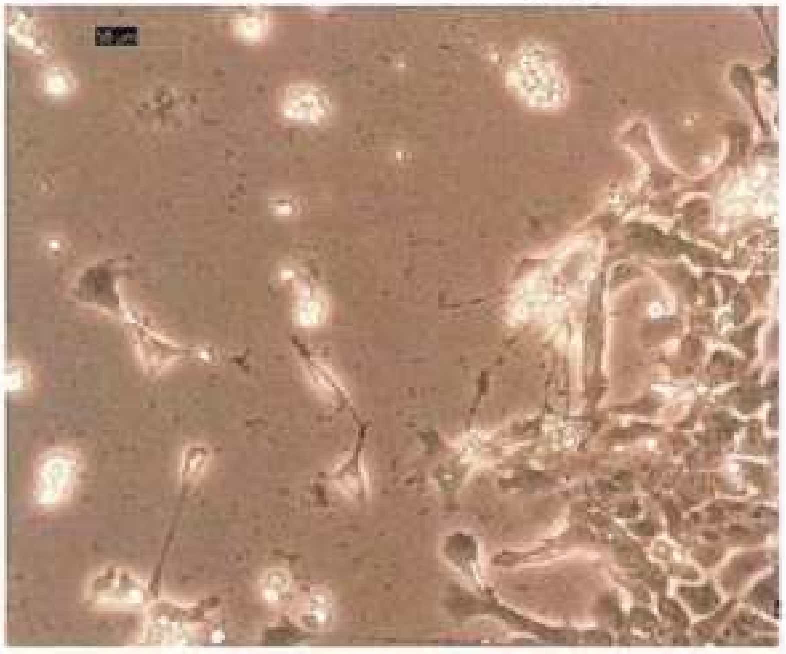
46c x400 / d = 1 [ب

46c x100 / d = 2 [ج

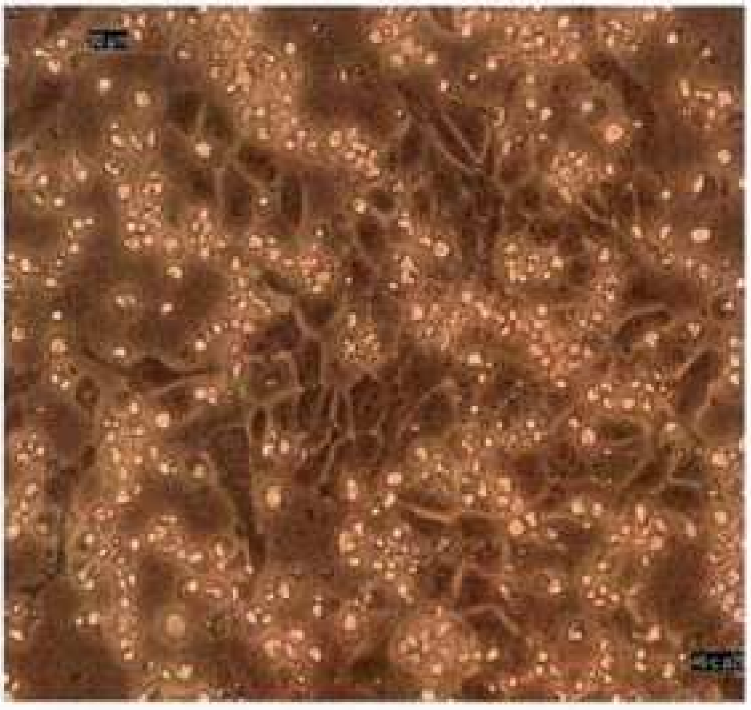


46c x200 / d = 2 [د

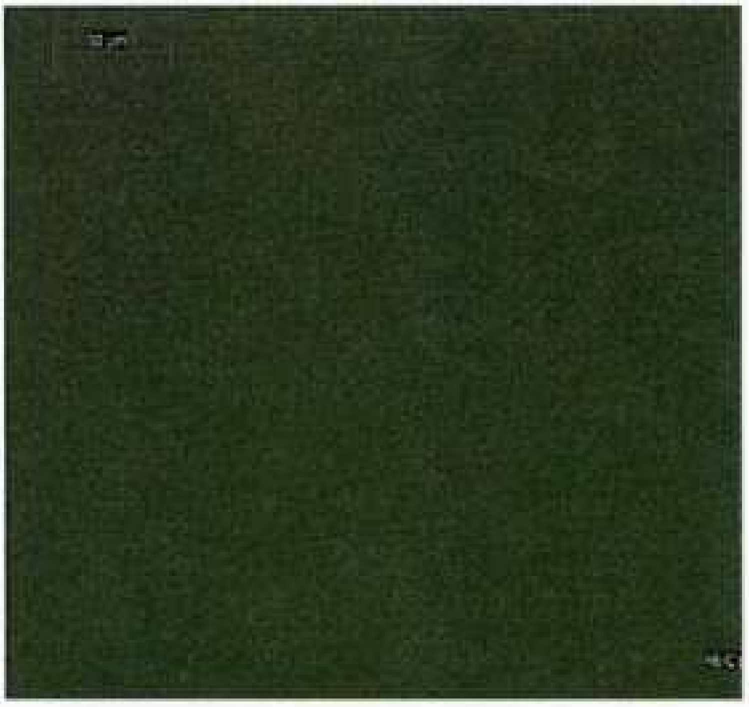
46c x400 / d = 2 [هـ]



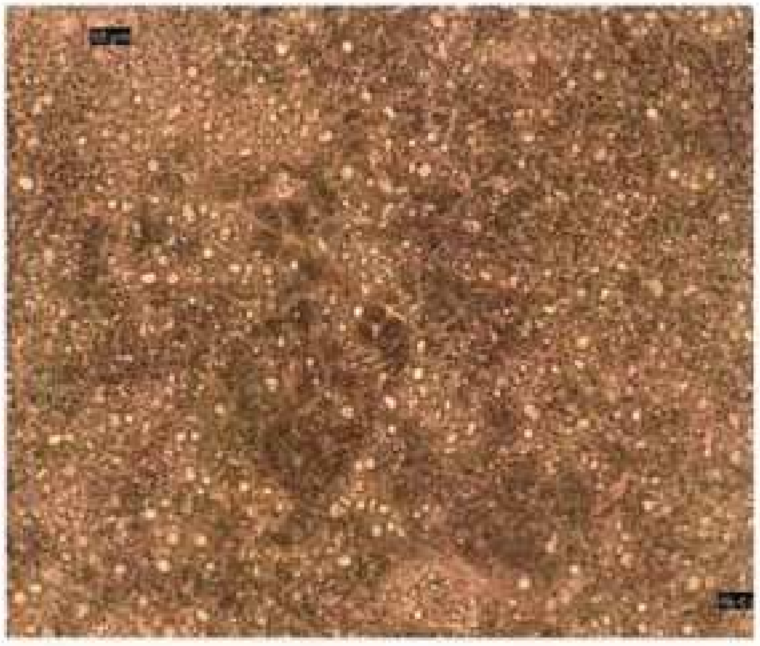
46c x200 / d = 3 [و]



46c x200 / d = 3 [ز]



46c x200 / d = 3 [ح]



46c x200 / d = 5 [ط]

46c x200 / d = 5 [ي]

46c x100 / d = 6 [ق]

46c x100 / d = 6 [ك]

46c- x200 / d = 6 [ش]

46c- x200 / d = 6 [ك]

شكل رقم 2 ــ دور الكاشف أو المخبر Sox1 – GFP النوعي العصبي في إظهار تمايز الخلايا الجذعية الجنينية 46c .(الصور من عمل الباحث)

أ ــ **في اليوم صفر** d= 0 day (d)

ب ــ **في اليوم الأول** d = 1 .

ج ــ د ــ هـ ــ **في اليوم الثاني** d=2 تبين بداية ابتعاد الخلايا من مركز التجمع الخلوي على شكل بتلات الوردة المتفتحة (rosette) وهذا هو تعبير GFP expression عن السليفات العصبية المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية 46C ضمن وسط التمايز N2B27 .

و ــ ز **في اليوم الثالث** d = 3 ، يلاحظ بأن الواسم Sox1 marker قد ارتفع نحو الأعلى على شكل حبيبات بيضاء اللون، لأن بعض الخلايا بدأت في التحول العصبي والبعض الآخر ستتحول عصبياً في أيام تالية، لذلك هي هنا ما زالت محافظة على خاصية الخلايا الجذعية الجنينية ــ سليفات الخلايا العصبية.

ح ــ **في اليوم الثالث** d = 3 - Fluorescence – Sox1 - GFP.

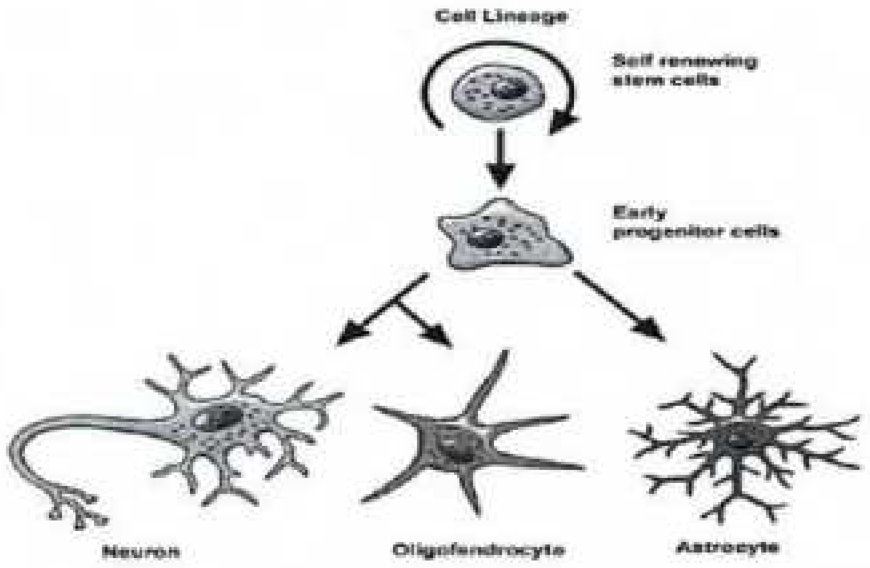
ط ــ **في اليوم الخامس** d = 5 يحدث انخفاض حاد لعدد خلايا Sox1 – GFP (سليفات الخلايا العصبية) لأن معظم الخلايا قد أصابها التمايز، لذا نلاحظ ازدياد عدد الحبيبات البيضاء اللون الطافية نحو الأعلى الدالة على ذلك .

ي ــ **في اليوم الخامس** d = 5 .Fluorescence – Sox1 GFP هذه الكتل الخضراء الكبيرة تؤكد ما تم شرحه في ط.

ق ، ش – **في اليوم السادس** d = 6

ل ــ ك: **في اليوم السادس** d = 6 .Fluorescence – Sox1 GFP ، تبين مدى فعالية – Sox1 GFP في وسط التمايز N2 B27 وهو بنسبة 80% تقريباً.

من خلال الأشكال السابقة نلاحظ أن الخلايا الجذعية الجنينية في وسط التمايز الخاص N2B27 تتجه إلى المصير العصبي (خلايا عصبية neurons وخلايا دبقية نجمية astrocytes وخلايا دبقية قليلة التغصن Oligodendrocytes)، طبقاً للمخطط التمثيلي الآتي:



(صورة مأخوذة من الانترنت عبر موقع غوغل)

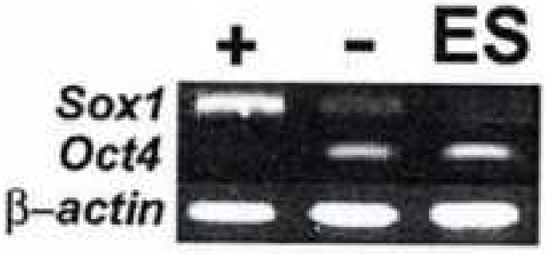
المناقشة

بين الباحث .Ying, Q وزملائه (Ying, Q., et al... 2003) بريميرات Primers الـ Sox1 وكذلك Oct4 وذلك حسب الجدول التالي

Primers for RT- PCR

Gene	Primers
Sox1	'5-CCTC GG ATCTCTGGTCAAGT-3' '5-TACA GAGCCGGCAGTCATAC-3'
Oct4	'5-GG CGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC-3' '5-CTC GAACCACATCCTTCTCT-3'

يبين الشكل التالي رقم (3) انفصال ال Sox1 وال Oct4 – تعبيرية الخلايا بوساطة FACS.RNAs والتي جهزت من الخلايا الجذعية الجنينيـة غيـر المتمـايزة 46C مـن ايجـابي-GFP (58.5%) وسلبي -GFP (17.5%) في اليوم الرابع للمستنبت المتمايز وتحليلها بوساطة.
RT – PCR. Bar . 50µm (ying, Q. et al ... 2003)



شكل (3)

(Separation of sox1 and oct4 – expressing cell by FACS. RNAs were prepared from Undiffernitiate 46C ES cells or from GFP- positive (58.5 %) and GFP- negative (17.5%) Populations on day 4 of momoculture Differentiation and analyzed by RT – PCR. Bar . 50µm.) (ying, Q. et al ... 2003).

عندما يزال التحريض على التجدد الذاتي Self renewal، فإن الخلايا الجذعية الجنينية، تفقد بسرعة النمط الظاهري اللاتمايزي، ومن ثم تتمايز، (Stavridis , M. and smith , A. G. 2003).

تلك الخصائص جعلت الخلايا الجذعية الجنينية في الحيوانات في نظام مناسب لتقديم أو لاستحداث التعديل الجيني النوعي (استهداف جيني gene Targeting) ومعرفة دوره الجيني خلال التمايز في الزجاج *in vitro*.

(Stavridis , M. and Smith , A. G. 2003)

بيّن الباحث Pevny , L. H وزملائه بأن لـــ SOX1 دوراً في التحديد العصبي. Neural determination وتمايزها باستخدام المحرض المعبر P19 نظام الخلية بوصفها موديل التكوّن العصبي في الزجاج in vitro، كما بيّن هؤلاء الباحثون بأن التعبير الفأري لـــ Sox1 يمكن أن يكون عوضاً عن المتطلب الضروري للحمض الرتينويك retinoic Acid لظهور المصير العصبي بشكل كاف لخلايا الأدمة الخارجية (Peveny , L.H. et al ... 1998).

بينما بيّن الباحث Wood , H. B. و Episkopu,V.، دور كل من جينات Sox3 , Sox2, Sox1 في التعبير الجنيني من بداية تشكل المعيدة وحتى مرحلة القطع الظهرية المبكرة لدى الفأر، حيث أن Sox1 هو تعبير الأدمة الخارجية المشكلة للميزابة العصبية، وSox2 وSox3 هما تعبير الأدمة الخارجية للخط الابتدائي، الأدمة الداخلية للمعي وكذلك ألواح حسية مستقبلية، وأثناء تشكل القطع الظهرية فإن كل الجينات الثلاثة هذه هي تعبير الأدمة الخارجية العصبية (Wood , H. B. , and Episkopu,V., 1999).

لقد استطاع الباحث Barraud, p. وزملائه في استخدام مُخبر أو كاشف Reporter الخط الفأري، بروتين الفلورة الخضراء Green fluorescence Protein (GFP) بإدخاله في الموضع Sox1، وتبين لهم بأن الكاشف GFP هو معبر مساعد أو مشارك Coexpressed مع بروتين SOX1 وكذلك مع واسمات أخرى معروفة للخلايا الجذعية العصبية والخلايا السليفة، وحيث أن نظام الكاشف Sox1 – GFP هو مفيد جداً لأجل تحديد وعزل وتوصيف الخلايا الجذعية العصبية والخلايا السليفة (Barraud, P. et al... 2005).

إن تجارب الاستنبات تبيّن بأن خلايا Sox1 – GFP المعزولة من الدماغ الجنيني يكون باعثاً على تكوّن الخلايا العصبية وكذلك الخلايا الدبقية في الجسم الحي *In vivo* (Barraud, P. et al... 2005) كذلك عمل الباحث Aubert, J. وزملائه في إدخال الكاشف GFP في الموضع Sox1 وبالتالي Sox1 – GFP الفأرية هي تعبير جين التخلق الداخلي المنشأ endogenous gene، وكذلك تم استخدام هذا الكاشف لتنقية الخلايا الظهارية العصبية (Aubert, j. et al ... 2003).

استخدم مقياس التدفق الخلوي Flow cytometry quantition وتسجيل النسيلات الفردية من قبل الباحث Ying, Q وزملائه، وتوصلوا إلى أن الجزء الأكبر من الخلايا الجذعية الجنينية قد حلّ بها التحوّل العصبي neural Conversion، وبالإمكان تنقية سليفات الخلايا العصبية بوساطة Fluoroscence activated cell Sorting (FACS) أو بوساطة اختيار العقاقير، وهذا النظام يحسّن كفاءة إنتاج الخلايا العصبية والدبقية المنتجة من الخلايا الجذعية عديدة المقدرة Pluripotent التشكلية الثديية (Ying, Q. et al... 2003).

ظهرت في مستنبتات الخلايا الجذعية الجنينية البشرية المنماة خلال 3 أسابيع، مناطق تشتمل على خلايا ذات استطالات خلوية قصيرة، أبدت وجـــود المركـــب N – CAM متعدد السياليك، وعند إعادة تسطح المناطق الخلوية المعزولة في أوعية استنبات في وسط لا يحتوي على السيروم، أظهرت هذه الخلايا واسمات مميزة للأدمة الخارجية العصبية الابتدائية مثل المركب N – CAM متعدد السياليك. (Reubinoff, B. et al … 2000).

توجد دراسة قديمة عن تكوّن معلق لتجمع كثير الخلايا ضمن المستنبت على هيئة تدعى الأجسام الجنينية Embryoid bodies (EBs)، ويوجد ضمن هذا التجمع، ثمة معقد تفاعلي بين مختلف الأنماط الخلوية نتيجة التحريض على تمايز الخلايا الجذعية إلى كل مشتقات الأدمات الجنينية. وتتوصل هذه الدراسة إلى ان التطور في الأجسام الجنينية هي مشابهة لتلك التي تحدث اثناء التكّون الجنيني الطبيعي للفأر حتى مرحلة تكّون الأدمة الجنينية الثالثة، أي الأدمة الوسطى (Martin , G. et al…. 1977) .

وتؤكد هذه النتيجة دراسة حديثة، على تمايز الخلايا الجذعية الجنينية للفأر، عند إزالة العامل LIF، إلى معقد ثلاثي الأبعاد لتجمعات خلوية هي الأجسام الجنينية، والتي تتمايز إلى أنماط خلوية متمايزة شبيهة لما يحدث عند التكوّن الجنيني في الجسم الحي (Boheler , K., et al … 2002) (Rathjen, j. 2000).

كما أن هناك دراسة أيضاً حديثة عن التمايز العصبي في الأجسام الجنينية EBs بعد معاملتها بحمض الريتنويك retinoic acid، وكذلك تحدثت عن نجاح مجموعة أخرى من العلماء في توليد الخلايا العصبية الحركية للنخاع الشوكي spinal cord motor neurons وذلك من الخلايا الجذعية الجنينية بعد معاملتها بحمض الريتنويك (stavridis , M. and smith , A.G. 2003) أو عند تعرضها لعوامل نمو أو وسط مشروط ملائم لأنماط خلوية أخرى وتفتقر تماماً لوسط التمايز الحر serum free differentiation medium . (Kim , M. et al … 2009).

لقد تبين بأن الخلايا الجذعية الجنينية لدى الإنسان عند تمايزها، تشكل بنى مشابهة للأنبوب العصبي في وجود عامل نمو الأرومة الليفية. (Fibroblast growth factor2 (FGF-2 وخاصة عند تجميع أجسام جنينية. وعندما تم إزالة العامل FGF-2، تمايزت سليفات الخلايـــا الـــعصبيـــة neural precursors المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية البشرية، بعد عزلها، إلى خلايا عصبية neurons وخلايا دبقية نجمية astrocytes وخلايا دبقية قليلة التغصنات oligodendrocytes (Zhang ,S., et al… 2001).

إن سليفات الخلايا العصبية المزروعة هي قادرة على إنتاج خلايا عصبية ناضجة وخلايا دبقية، وبالتالي يمكن أن تحضرّ من الخلايا الجذعية الجنينية (Zhang ,S., et al… 2001). وقد أظهر

الباحث Zhang وزملائه من خلال تجربتهم في ازدراع سليفات الخلايا العصبية المشتقة من الخلايا الجذعية الجنينية في دماغ فأر حديث الولادة، بأن هذه السليفات اندمجت في مختلف مناطق الدماغ، بل وتمايزت إلى خلايا عصبية وخلايا نجمية، ولم يُلاحظ أي تشكل لورم مسخي في المتلق المزدرع، وأسفرت نتائج بحثهم على أن الخلايا الجذعية الجنينية كمصدر لسليفات الخلايا العصبية المزدرعة، قادرة على إصلاح الجهاز العصبي.

إن إشارات التحريض وعوامل الانتساخ Tran scription factors المرتبطة في ذرية الخلايا العصبية الحركية يطرح سؤالاً ، ما إذا هذه الرؤى النمائية يمكن استخدامها في توجيه الخلايا الجذعية نحو المصير العصبي الحركي، وإن عوامل الإشارات ذات الصلة، يمكن أن تحرض الخلايا الجذعية الجنينية عند الفأر على التمايز إلى خلايا سليفة النخاع الشوكي **spinal progenitor cells** ومن ثم إلى خلايا عصبية حركية في الجسم الحي *in vivo* (wichterle , H. et. al… 2002).

وقد نجح الباحث Dimos. J وزملائه في توجيه تمايز الخلايا الجذعية عديدة المقدرة التشكيلية، والتي تمتلك خصائص الخلايا الجذعية الجنينية، إلى الخلايا العصبية الحركية، لدى امرأة مصابة بالتصلب الجانبي الضموري. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) بعمر 82 سنة. (Dimos , j. et al… 2008)

المراجع

1- AUBERT,J., STAVRIDIS , M.J. TWEEDIE , S., O'REILLY , M., VIERLINGER , K., LI, M., GHAZAL , P., PRATT, T. , MASON, J. , ROY, D. , SMITH , A., 2003- **Screening mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from SOX1-gfp KNOCK- in mice**.*PROC NATL ACAD Science*.(100) suppl1,11836-41.

2- BARRAUD, P., THOMPSON , L. , KIRIK, D., BJORKLUND, A. PARMER , M., 2005- **IsoLation and characerization of neural Precursor cells from the Sox1 – GFP reporter mouse**. *Eur j Neuroscience*(22) 7, 1555 – 69.

3- BOHELER, K.R. , EZZGZ ,J., TWEEDIE , D., TIAN YANG, H., ANISIMOV, S., V. and wOBUS, A. N., 2002-**Differentiation of pluripotent Embryonic stem cells into Cardiomyocytes** . *CirC. Res;* (91), 109 – 201.

4- DIMOS, J. RODOLFA, K. T., NIKAN, K. K., WEISENTHAL, L., K., MITSUMOTO, H., CHUNG, W. , CROGFT,G.F.,SAPHIER,G., LEIBEL,R.,GOLAND,R.,WICHTERLE , H., HENDERSON C.,N.,. EGGAN, K., 2008 **-Induced pluripotent stem cells. Induced pluripotent stem cells generated from Patients with ALS can be differentiated into motor neurons** . *science*,(321) 5893, 1218 – 21.

5- KIM, M., HABIBA, A., DOHERTY, J., M., MILLS ,J.,C., MERCER, R., W., HUTTNER, J.,E., 2009- **Regulation of mouse embryomic stem cell neural differentiation by retinoic acid** . *Developmental Biology*, vol (328) , 456- 471.

6 - MARTIN , G., R. , WILEY , L., M., and DAMJANOV, 1977- **The development of cystic embryoid bodies *in vitro* from clonal terato carcinoma stem.** *Developmental Biollogy* , vol. (61) 2 , 230 – 244

7- PARMAR , M. and LI, M., 2007- **Early specification of dopaminergic phenotype during Es cell defferetiation** *BMC Developmental Bicllogy*, p. 1-9.

8- PEVNY, L.H., SOCKANATHAN , S., PLACZEK, M., LOVELL – BADGE, R., 1998-**A role For Sox1 in neural determination**.*Development* . (125) 10 , 1967 – 78.

9- RATHJEN, J., 2000- **mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation**. *Curr opin Gent Development*. (II),. 587- 594.

10- REUBINOFF , B., E., PERA, M.,F., FONG, C- Y., TROUNSON, A., BONGSO , A., 2000- **Embryonic stem cell from human blastocysts: Somatic differentiation in Vitro**. *Nature Biotechnoligy* (18), 399 – 404.

11- STAVRIDIS , M., P., and SMITH, A., G., 2003 – **Neural differentitiom of mouse embryonic stem celle**. *Biochemical Society transactions* , (31)1,45 – 49.

12- WICHTERLE , H., and PELJTO, M., 2008- **Differentiation of mouse embryonic stem cells to Spinal motor neurons**. *Curr protoc stem cell Biol* chopter1 , unit 1H.1.1 – 1H ,1.9.

13- WICHTERLE, H., LIEBERAM, I., PORTER, J.,A., JESSELL, T.M., 2002- **Directed differentiation of embryonic stem cell into motor neurons** . *cell* . (110) 3, 385 – 397.

14 - WILES M.,JOHNSSON, B., 1999- **Embryonic stem cell development in chemically defined medium** . *Exp cell Res,* (25:247)1,241-248.

15-WOOD , H., B., EPISKOPU, V., 1999- **Comparative expression of the mouse Sox1 , Sox2 and Sox3 genes from pregastrulation to early Somite stages**. *Mech. Der.* ,(1 – 2), 197 – 201.

16- YING, Q. L., STAVRIDIS , M., GRIFFITH , D., LI, M., SMITH, A., 2003- **Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture**. *Nature Biotechnology* ,(21), 183 – 186.

17- ZHANG S., C., WERNIG , M., DUNCAN , D., BRUSTLE, O., THOMSON , J., A., 200- ***In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cell** .*Natuer Biotechnology* ,(19), 1129 – 1133.

The experimental contribution for neural differentiation study of mouse Embryonic stem cells : Sox1 (46C) *In Vitro*

Amira Aumari

Department of animal biology – Faculty of Sciences – Damascus University – Syria

Abstract

Mouse Embryonic stem cells Sox1-GFP(46c cell line) were cultured in flasks/dishes with medium GMEM supplemented with leukemia inhibiting factor (LIF). LIF is required to inhibit differentiation mouse ES cells. Cell culture flasks/dishes were pre-coated with bovine gelatin 0.1% and the cultures incubated in an incubator temperature 36.7-36.9°C and 4.2-4.9%CO_2. Cultured cells were very healthy and quality, cells were harvested as to splitting and then ES cells were plated on gelatinized tissue culture plastics in N2B27 medium, which showed that the Sox1-GFP is a neural specific reporter and fine for the isolation and characterization of neural stem cells. Differentiation 46C started on the first day, on the day between the fourth and seventh,60-80% Sox1 expression and then Sox1 expression starts to decrease.

Key Words :

Embryonic Stem cells , Neural Progenitor , Cell differentiation, Transcription factors، Sox1- GFP.