J.Agric.Chem. and Biotechn., Mansoura Univ.Vol. 3 (9): 345 - 355, 2012

CONSERVATION AND CULTIVATION OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS AND DEVELOP INTO NEURAL CELLS

Aumari, Amira
Dept. of Animal Biology-Faculty of Sciences-Damascus University-Syria

حفظ واستنبات الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية وتطويرها إلى خلايا عصبية

أميرة أومري
قسم البيولوجيا الحيوانية-كلية العلوم-جامعة دمشق-سورية

الملخص

تمتلك الخلايا الجذعية قدرة مدهشة على أن تتمايز إلى كل الأنماط الخلوية للأدمات الثلاث إذا تسنى لها بيئة مناسبة لذلك، كما لها قدرة كاملة لأجل تطبيقات الهندسة النسيجية، إذ من الممكن استخدامها كعلاج بديل-العلاج بالخلايا- وهي واحدة من أهم العلاجات الواعدة لأجل الأمراض العصبية المستعصية كمرض باركنسون.
تم استخدام خطين خلويين مأخوذة من الكتلة الخلوية الداخلية الكيسة الأريمية blastocyst للفأر Cell Line: 1- OCT4-GFP. 2-SOX1-GFP.
تم استنبات الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية في أوساط GMEM أوDMEM مع عامل التثبيط اللوكيمي LIF، وكما تم استنباتها في تلك الأوساط بدون LIF، وتم إضافة عوامل التمايز إلى الخلايا العصبية. كانت الخلايا المستنبتة سليمة وصحية وجيدة، وبالتالي تم الحفاظ على بعض منها في السائل النتروجيني، لكن حصل ولمرة واحدة، أن تعرضت بعض المستنبتات إلى التلوث، وتم التخلص منها.
إن تقانة حفظ واستنبات الخلايا الجذعية الجنينية يحتاج إلى جهد وعمل مضني ومعرفة تامة، لإبقاء تلك الخلايا على صحتها وسلامتها وجودتها وبالتالي إمكانية حفاظها في السائل النتروجيني. وكذلك الأمر بالنسبة إلى إمكانية تمايزها إلى خلايا عصبية، عند إزالة العوامل المثبطة لذلك.
تم ذكر كل الإجراءات التطبيقية اللازمة لتحقيق هذه الأهداف، لكي يستفيد منها، وخاصة محليا، كل باحث في هذا المجال.

الكلمات المفتاحية: الخلايا الجذعية الجنينية، المستنبت، وسط الاستنبات، وسط التمايز، عامل التثبيط اللوكيمي (LIF)

المقدمة

يثير اهتمام الباحثين في مجال الخلايا الجذعية سواءً أكانت جنينية أم بالغة إلى عزلها واستنباتها بطريقة سليمة وصحية في الزجاج *in vitro* وحفظها في السائل النتروجيني لمدة طويلة، وبالتالي أردنا في هذا البحث أن نضع خطوات عملية مهمة في استنبات الخلايا الجذعية الجنينية المأخوذة من الكتلة الخلوية الداخلية للكيس الأريمي blastocyst للفأر(Miho,K.F., *et al*…2007) لأن في السنوات الأخيرة تم تطوير بروتوكولات الاستنبات بشكل يسمح للخلايا الجذعية الجنينية غير المتمايزة أن تتمايز إلى مختلف أنواع الخلايا المتمايزة في الزجاج (Miho,K.F., *et al*…2007).
من المعلوم من أجل استنبات الخلايا الجذعية الجنينية سواءً للفأر أم للبشر، باستمرار يجب أن تحفظ بحالة غير متمايزة (Tremml,G.,et ak..2008) وهذه الخلايا تمتلك القدرة على التجدد الذاتي self-renewal (Jackson, M., *et al*…2010) (Yuin- Han, L., *et al*…2006) كما أن لها القدرة على النمو إلى ما لانهاية مع الحفاظ على القدرة المتعددة Pluripotent التشكلية (Ulla- Montoya,F.,*et al*..2005) (kaztushi,T.,and shinya,y.,2006)إذا أعطيت لهذه الخلايا حرية التمايز فإنها تمتلك القدرة على التمايز إلى خلايا الأدمات الثلاث
(Ulla-Montoya,F.,*et al*..2005 (kaztushi,T.,and shinya,y.,2006)
(James , t., *et al*…1995) (Yu, J., and Thomson, J.A., 2008)

تلك الخصائص مهمة جداً للحصول على خطوط الخلايا ذات القدرة المتعددة التشكلية، وكذلك لفهم عمليات التمايز، وأيضاً من أجل علاجات الزرع الخلوي أو العلاج بالخلايا(Thomson, J.A., 2008 (Ding,Y.,*et al*..2008)(Yu,J.,and وبالتالي من أجل علاج مجموعة من الأمراض المستعصية مثل مرض باركنسون Parkinson's disease وأذيات النخاع الشوكي، ومرض السكري diabetes ،ولهذا يحاول العلماء توليد خلايا ذات القدرة المتعددة التشكلية مباشرة من خلايا المرضى أنفسهم ,Kazutoshi) (T., and shinya, y., 2006لابد من وجود عوامل نسخ والتي تلعب دوراً مهماً في الحفاظ على هوية الخلايا الجذعية الجنينية وكذلك تلعب دوراً في حث القدرة المتعددة Pluripotent التشكلية في الخلايا الجسمية وذللك للحصول على خلايا جذعية ذات القدرة المتعددة المحفزة induced pluripotent stem(ips)cells

مثل(Niwa *et al*…2000) (yuin-Hun, L., *et al*…2006) oct4, oct3
(Qi-long,Y.,*et al*..2003) و SOX1,SOX2
(Avilion,A *et al*…2003) (QI-Long, y., *et al*…2003) (Qi-Long,Y.,*et al*..2003) و
(Chamberes, I., *et al*…2003) Nanog

يهدف هذا البحث إلى دراسة التقانة المثلى لحفظ كفاءة الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية واستنباتها وكيفية تطويرها إلى خلايا عصبية من أجل استخدامها في التطبيقات السريرية.(وذلك من خلال تجربة الباحث العملية)

مواد البحث وطرائقه

إجراء التجارب:

أجريت التجارب في مختبر الخلايا الجذعية الجنينية-المدرسة الطبية في جامعة ابردين-اسكوتلندا.

قبل إجراء أي تجربة، يجب تعقيم الأيدي وأماكن العمل بإيتانول 70%، والإجراء نفسه يقام به عند الانتهاء من العمل.

أجريت التجارب على خطين خلويين من الخلايا الجذعية الجنينية للفأر، مأخوذة من مرحلة الكيسة الأريمية أو الحويصل الأصل blastocyst، والتي تعد خلايا ذات قدرة متعددة pluripotent التشكلية والتي تمتلك المقدرة على التمايز إلى الأدمات الثلاث وبالتالي تحتفظ بقدرتها على إعطاء كل أنواع الخلايا المتمايزة في الزجاج *in vitro*

(Miho, KF., *et al*..2007)
Cell Line: 1- OCT4-GFP. 2-SOX1-GFP.

وتم الحصول عليهما من Dr.Smith-معهد لأجل أبحاث الخلايا الجذعية –ادنبرغ

استعملت الأدوات والمواد والأجهزة اللازمة الآتية:

الأدوات:

-أطباق بتري معقمة خاصة لعمليات الزرع.
-عبوات أو أنابيب.Falcon tubes
-أنابيب مخروطية الشكل.Nunc tubes
-أنابيب صغيرة خاصة لعمليات التجميد.Cryotubes
-علبة جليدية لوضع الأنابيب الخاصة بالتجمد.Mister frosty box
-قطّارات مختلفة الانواع والأحجام.Micropipettes

المواد:

- بوفر Phosphate Buffered Saline
- تربسين ،أنتي تربسين Antitrypsin, Trypsin
2 -Mercaptoethanol-
Nonessential Amino Acids (NEAA)-
Fungi Zone-
DMSO-
-Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)-
Streptomycine ,Penicillin-

جيلاتين-
-أوساط DMEM , GMEM
Fetal Calf Bovine Serum-
الأجهزة:
- حاضنة T-TEMPC –Co2-incubaton -ذات حرارة 36.7°م، و CO2 4.9%-4.2%
- حمام مائي موديل Grant 28 بدرجة 36.5-37° م
- جهاز الطرد المركزي موديل THRMO
- خيمة استنبات خاصة بالخلايا الجذعية الجنينية موديل TRIMAT2
- مجهر موديل Leica DMIL مع CCD كاميرا رقمية DFC42C موصول بحاسوب موديل Dell

أ- تحضير وسط الاستنبات :

نأتي بعبوة سعة 500 مل من وسط نمو الخلايا من:
DMEM (Double Cco's Modified Eagle Medium) (Gibco 1331)
أو GMEM (Glasgow Modified Eagle Medium) (Gibco 21710)
يفضل الوسط الأول لأجل OCT4- GFP، والثاني لأجل SOX1-GFP
(Qi-Long, y., *et al*…2003) (Parmar, M., and Li,M., 2007)
ونضيف إليها المكونات التالية:
2- mercaptoethanol (Gibco 31350-010) بمقدار 5µl
Nonessential Amino Acids (NEAA) (Gibco 11140-350) بمقدار 1:100
10% Fetal Calf Bovin Serum (FCS)
Fungi Zone بمقدار 1:100
Penicillin/Streptomycin (P/S) بمقدار 1:100
Leukemia Inhibitory Factor (LIF) بمقدار 1µlفي 10 مل
ويتم حفظ هذا الوسط الجاهز في البراد لاستخدامه تباعاً

ب- تحضير وسط التجميد Freezing Medium:

40% serum
20% DMSO +
40% medium with LIF+

حـ تحضير وسط التمايز أحادي الطبقة N2B27: Monolayer Differentiation medium

1-تحضير محلول A:

DMEM/F12 أو GMEM
مضاف إليها المكونات التالية:
NEAA بمقدار 1:100
Mercaptoethanol -2 بمقدار 5µL في 500 مل
N2 suplement بمقدار 1:100
Fungi Zone بمقدار 1:100
Penicillin Streptomycin بمقدار 1:100

2-تحضير محلول B:

Neurobasal Medium
مضاف إليها: B27 بمقدار 1:50
Fungi Zone بمقدار 1:100
Penicillin Streptomycin بمقدار 1:100
ونقوم بمزج المحلولين B+A بمقدار 1:1 ونسمي هذا الوسط الناتج بـ N2B27 medium

النتائج والمناقشة

قلة هي الأبحاث التي تشرح إجراءات تفصيلية تطبيقية عن كيفية حفظ أو صيانة واستنبات الخلايا الجذعية الجنينية وعملية تمايزها إلى أنماط خلوية معينة. وكذلك ماهي المحاليل والمواد الكيميائية اللازمة لذلك مع مقاديرها. في هذا البحث إجراءات تفصيلية لأجل عمليات حفظ واستنبات الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية وعملية تمايزها إلى خلايا عصبية، ولا غرابة في ذلك، ان تُذكر تلك الإجراءات في فقرة النتائج والمناقشة كما في العديد من الأبحاث التي تتحدث فقط عن التقانات المستخدمة. (Smith, A.G, 1991) (Parmar, M., and Li, M., 2007)

أولاً: حفظ وصيانة الخلايا الجذعية الجنينية:

من أجل بقاء الخلايا الجذعية الجنينية بصورة دائمة صحية وسليمة وجيدة واستنباتها دون تعرضها للتلوث، يجب **أولاً**، تغيير الوسط كل يوم، **ثانياً**، إجراء عملية التشطر splitting بمقدار 1:4 كل يومين أو ثلاثة أيام (حسب مقدار تزاحم الخلايا)، **ثالثاً**، إضافة LIF لتثبيط تمايز الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية مع كل وسط جديد (Smith, A.G.,1991)، **رابعاً**، يجب ألا تزيد عدد مرات مرور الخلايا نتيجة عمليات التشطر عن 50 مرة، منعاً لحدوث تشوهات في الكاريو تايب (Wiles, M.V., and Johansson, Bu. 1999) (Hoffman, L.M., and Carpenter M.K.2005)

ثانياً: إذابة Thawing الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية murine embryonic stem cells من السائل النتروجيني:

1-استخراج عبوة وسط الاستنبات المحضرة مسبقاً من البراد ووضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م ولمدة 20/د قبل نقلها إلى خيمة الاستنبات.

2-طلي الأنابيب Falcon Tubes الخاصة بعمليات الاستنبات بجيلاتين 0.1%.

3-يتم وضع أنبوبة التجميد المحتوية على الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية والمستخرجة من السائل النتروجيني، في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م لمدة قصيرة لا تزيد عن 5/د، قبل نقلها إلى خيمة الاستنبات.

4-تفريغ محتوى أنبوبة التجميد من الخلايا الجذعية الجنينية بوساطة ماصة ونقلها إلى الأنبوبة المخروطية nunc Tube بعد صب الوسط فيها DMEM أو LIF + GMEM

5-بحذر شديد، يتم اخضاع هذه الأنبوبة لعملية النبذ داخل جهاز الطرد المركزي بمقدار 1200 دورة/5 دقائق.

6-بعد الانتهاء من عملية النبذ، يتم سحب الوسط المعلق من الأنبوبة دون المساس بالخلايا الجذعية الجنينية الفأرية والتي تجمعت على شكل كتلة كروية pellet cells، وبعد ذلك يتم صب الوسط الجديد فوقها وخلطها جيداً مرات عدة وبحذر شديد، حتى تتفرق تلك الخلايا عن بعضها البعض قدر المستطاع.

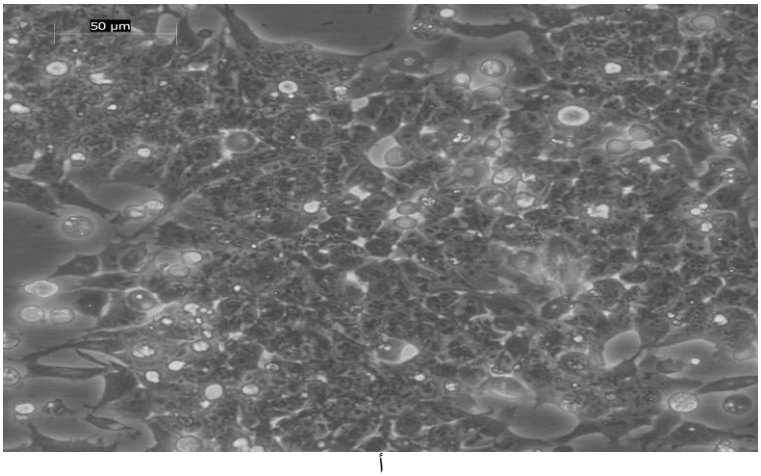
7-يتم صب المحتويات في الأنابيب المطلية بالجيلاتين، وتُفحص تحت المجهر لرؤية الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية، وتبدو الخلايا على شكل حبيبات مكورة وطافية وتكون على شكل جماعات وأخرى فرادى.

8-تحفظ هذه الأنابيب في حاضنة بدرجة حرارة 37°م و2Co 4.2-4.9% لفحصها في اليوم التالي.

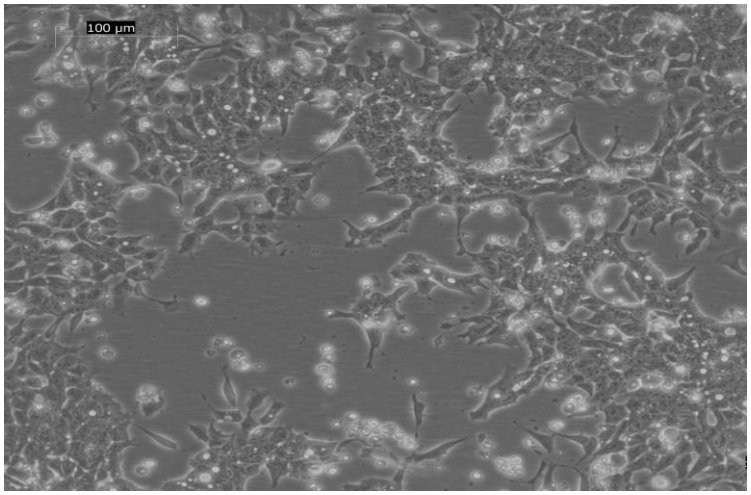
ثالثاً: تغذية Feeding الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية:

1-في اليوم التالي وبعد عملية فحص الخلايا الجذعية الجنينية تحت المجهر، للتأكد من صحتها وسلامتها ،يتم سحب الوسط من الأنابيب الحاوية على الخلايا الجذعية الجنينية بحذر شديد.

2-يتم صب الوسط الجديد فوقها مع LIF وتحفظ من جديد في الحاضنة. يبدي الشكل رقم(1) الخلايا الجذعية الجنينية بعد تغذيتها، وتبدو سليمة وصحية وجيدة.



أ



ب

الشكل رقم(1) الخلايا الجذعية الجنينية بعد تغذيتها : أ- X200 ب-X100

رابعاً: تشطر splitting الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية:

1-بعد يومين أو ثلاثة أيام وعند فحص الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية تحت المجهر، يمكن رؤية تزاحم الخلايا إلى جانب بعضها البعض وكذلك فوق بعضها البعض نتيجة تكاثرها هذه الخلايا أصبحت مستقرة بقاع الأنابيب وممتدة.

2- تم شطر محتوى كل أنبوبة إلى 4 أنابيب أي 1:4.

3-سحب الوسط من داخل الأنبوبة.

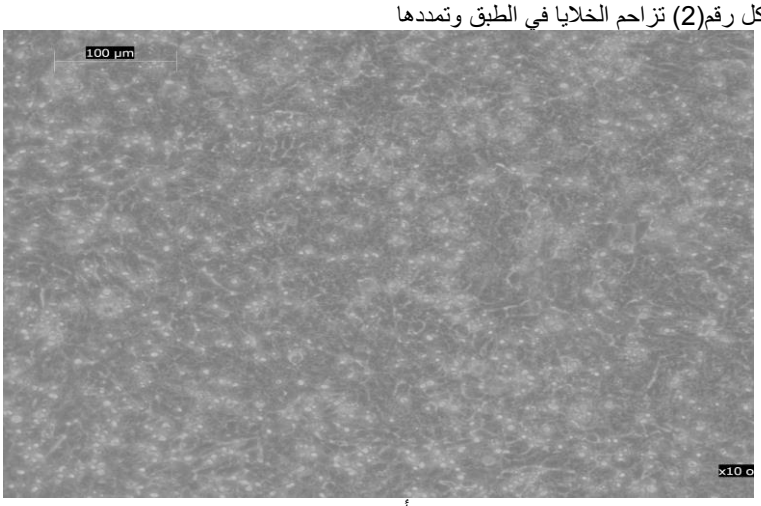
4-صب محلول PBS بمقدار 1 مل إلى داخل الأنبوبة ولمدة 1-2/ثانية لغسل أو شطف الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية ثم سحبها.

5-إضافة التربسين بمقدار 0.4-0.5 مل ثم توضع الأنبوبة مع محتوياتها الحاضنة لمدة 3/دقائق.

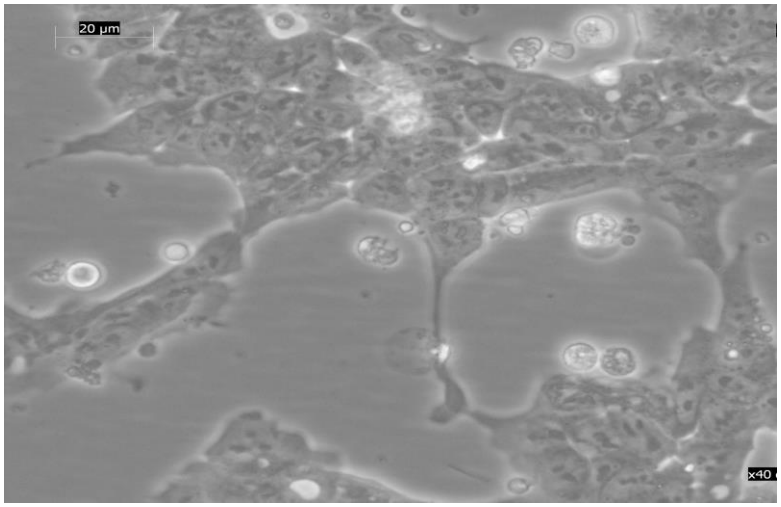
6-إضافة أنتي تربسين بنفس مقدار التربسين.

7-صب الوسط الجديد فوقها وخلطها.

8-نقل كل محتويات الأنبوبة إلى أنبوبة مخروطية الشكل لتعريضها لعملية النبذ.
9-بعد عملية النبذ تكرر رقم 6و7و8 من ثانياً.
يبدي الشكل رقم(2) تزاحم الخلايا في الطبق وتمددها



أ- X100



ب- X400

الشكل رقم(2) الخلايا الجذعية الجنينية وهي متزاحمة نتيجة تضاعفها ومستقرة في قاع الطبق

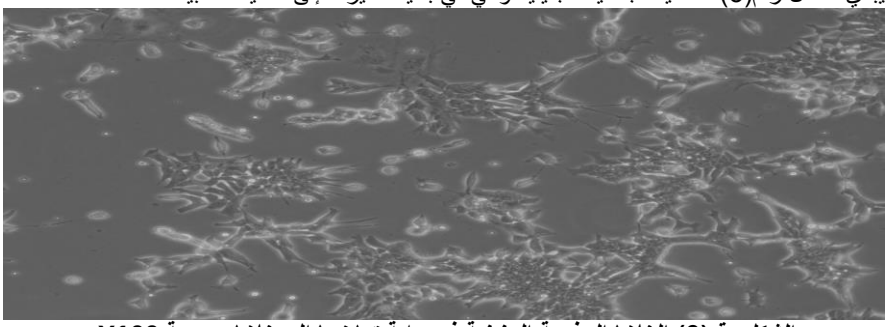
خامساً: تجميد freezing الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية:
1-تعاد خطوات رابعاً من 1 إلى .8
2- بعد عملية النبذ، يتم سحب الوسط، وصب وسط جديد مع LIF وخلطها جيداً.
3-نقل محتوى الخلايا الجذعية الجنينية من الأنابيب المخروطية إلى أنابيب التجميد Cryotube بعد كتابة التاريخ وعدد مرات المرور واسم الخط الخلوي عليها.
4-توضع أنابيب التجميد داخل علبة التجميد الخاصة بها ومن ثم يتم صب وسط التجميد freezing medium قطرة قطرة فوق الخلايا وبحذر وهدوء شديدين مع الخلط.
5-يتم تغطية الأنابيب وكذلك علبة التجميد، وتوضع في الثلاجة (4-) لمدة نصف ساعة.

6-تنقل العلبة بعد مرور الوقت إلى الثلاجة (81-) وتترك لليوم الثاني.
7-تنقل محتويات العلبة أي أنابيب التجميد إلى السائل النتروجيني (120-). وتحفظ لحين الحاجة.

سادساً: تمايز differentiation الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية في الزجاج *in vitro*:

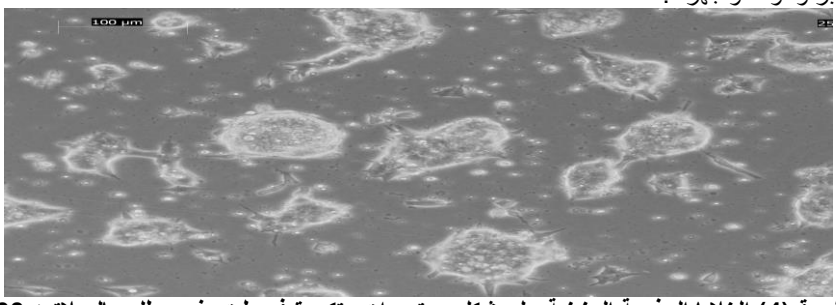
1-تعاد خطوات رابعاً لكن دون إضافة العامل المثبط اللوكيمي LIF إلى وسط الاستنبات.
2-مزج محلول A ومحلول B في عبوة واحدة بنسبة 1:1.
مثلاً يتم أخذ 25 مل من محلول A و25 مل من محلول B وتكتب على الأنبوبة B+A وهذا هو وسط التمايز N2B27.
3-بعد وضع وسط التمايز إلى الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية، يتم توزيعا في آبار ضمن طبق بمقدار 4-5 مل لكل بئر. ومن ثم تنقل وبحذر شديد إلى الحاضنة.
4-يتم كل يومين تغيير وسط التمايز.

يبدي الشكل رقم(3) الخلايا الجذعية الجنينية وهي في بداية تمايزها إلى خلايا عصبية



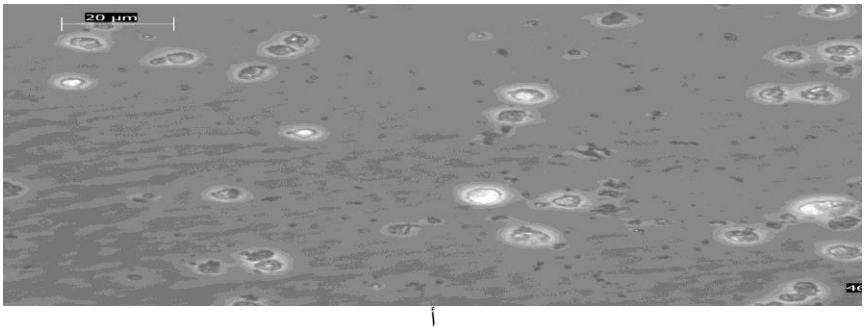
الشكل رقم(3) الخلايا الجذعية الجنينية في بداية تمايزها إلى خلايا عصبية X100

تمت في بعض الحالات استنبات الخلايا الجذعية الجنينية في أطباق خاصة دون طليها بالجيلاتين أو بأي مادة أخرى وكانت الخلايا تستجيب لذلك بأن تمتد وفي قعر الطبق وتستقر لكن يلاحظ عند ذلك بأن بعض هذه الخلايا تتجمع إلى بعضها البعض وتتكور أكثر من تلك التي تكون في الأطباق المطلية بالجيلاتين. يبدي الشكل رقم(4) الخلايا الجذعية الجنينية في قعر الطبق غير المطلي بالجيلاتين ، وتبدو هذه الخلايا كمستعمرات متكورة نتيجة تجمعها بشكل أكبر المستنبتات الخلوية كلها كانت سليمة وجيدة وصحية وبالتالي تم اللجوء وباستمرار إلى الحفاظ على الخلايا الجذعية الجنينية في السائل النتروجيني، إلا أن هناك حصل ولمرة واحدة أن تعرضت بعض المستنبتات الخلوية إلى تلوث، وبالتالي جرى التخلص منها بطريقة كيميائية وتم تعقيم كل المختبر وأدواته وأجهزته.

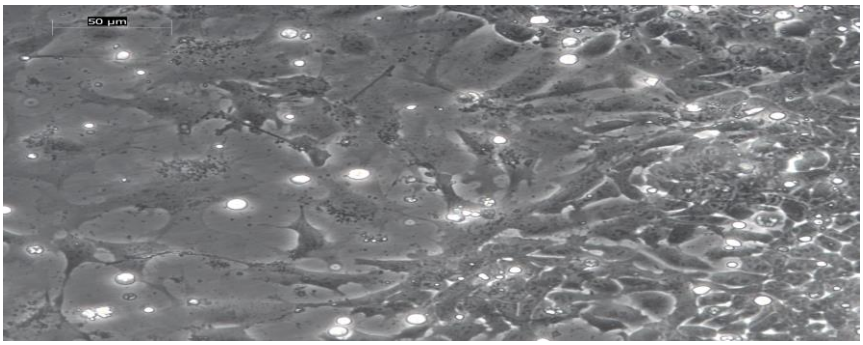


الشكل رقم(4) الخلايا الجذعية الجنينية على شكل مستعمرات متكورة في طبق غير مطلي بالجيلاتين X100

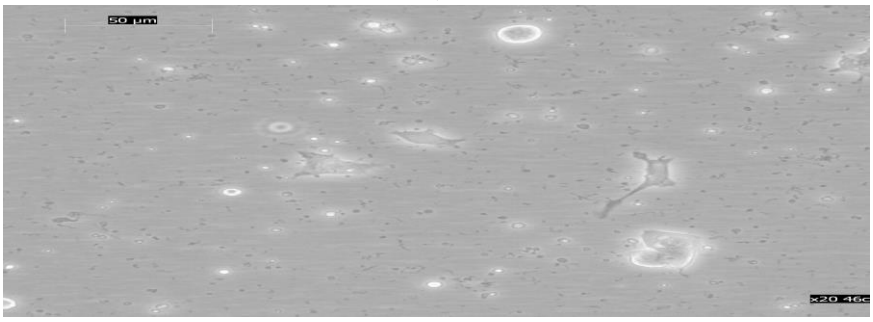
يبدي الشكل رقم(5) تلوث الخلايا الجذعية الجنينية بأشكالها المختلفة



أ



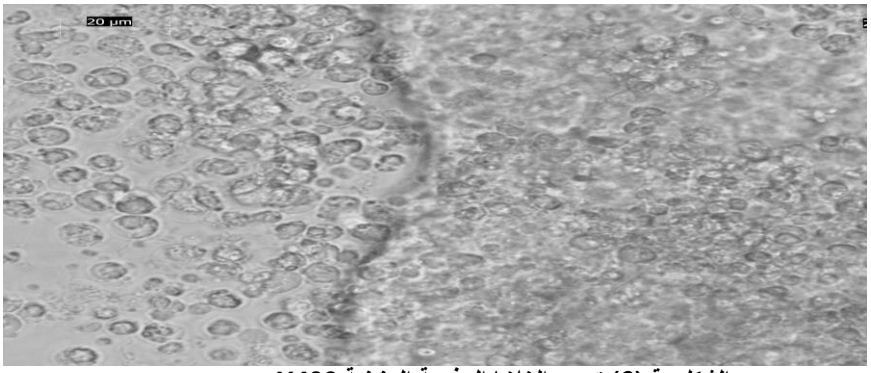
ب



ج

الشكل رقم(5) تلوث الخلايا الجذعية الجنينية بأشكالها المختلفة أ- X400 ، ب-X200 ، ج- X200

وهذه الصورة تختلف تماماً عن المستنبت التي تكون فيها كثير من الخلايا أصابها التموت نتيجة عدم استجابتها للوسط أو للبيئة المحيطة التي تعرضت لها.
يبدي الشكل رقم(6) تموت الخلايا الجذعية الجنينية وتبدو ذات أشكال دائرية فارغة



الشكل رقم(6) تموت الخلايا الجذعية الجنينية X400

كثير من الأبحاث تتحدث عن التقانات والتي توصف فيها مستنبت الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية، وتؤكد على وجود LIF من أجل تثبيط التمايز عند إضافتها إلى وسط الاستنبات (Furue, M., *et al*…2005) لكن الباحث Conner يدعو إلى استخدام الأرومة الليفية لجنين الفأر Mouse embryo fibroblast(MEF) كطبقات تغذية مع وجود LIF لمنع حدوث التمايز (conner,DA.,2001).

لأن LIF في وسط الاستنبات هو كافٍ لتحريض الخلايا على التكاثر، والمحافظة على أن تتجدد ذاتياً باستمرار (Furue, M., *et al*…2005) وكذلك حدوث التمايز عند حذف LIF من وسط الاستنبات أو بطريقة أخرى هي إضافة محرضات كيميائية كحمض الريتيونيك retinoic acid أو 3-ميتوكسيبنزاميد 3-MethoxyBenzamid amid (Smith, A.G.1991)

وهذا يتوافق مع التقانة المستخدمة في هذا البحث بالنسبة لـLIF كمثبط للتمايز، ولكن في المقابل لم يتم استخدام محرضات كيميائية كحمض الريتيونيك أو 3-Methoxy Benz amid لحث الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية على التمايز (Smith, A.G.1991) (Miho .K.F., *et al*…2007) وإنما تم استخدام المحلولين A و B كما هو مذكور سابقاً. كما تم استخدام وسط للاستنبات بدون عوامل التمايز.

وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحثان Wiles, MV. و Johansson, (Wiles,MV., B.M.Johansson,BM1999) حيث عند ترك الخلايا الجذعية الجنينية في وسط محروم من مثبطات التمايز فإنها تتمايز كأجسام جنينية embryoid bodies إلى أدمة خارجية عصبية neuroectodermوبوجود عامل BMP4 يؤدي إلى تحريض عمليات مشابهة لهيئة الخط الابتدائي في الخلايا الجذعية الجنينية وربما في الجسم الحي *in vivo* (Wiles,Mv., and Johansson, BM., 1999)

وهذا ما ذكره Ying بأن BMP4 هو ضروري لأجل الحفاظ على الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية بحالة غير متمايزة في وجود LIF في الوسط، وبالتالي بعدم وجود LIF فإن ذلك يساعد الخلايا الجذعية الجنينية على التمايز إلى خلايا عصبية وخلايا دبقية (Miho.K.F., *et al*…2007) (Qi-Long, y., *et al*…2003) (Starvridis,MP.and Smith,AG.2003) بينما في المقابل حولت الـFGF-2 تمايز الخلايا الجذعية الجنينية الفأرية إلى خلايا شبيهة الخلايا العصبية والخلايا الدبقية (Furue M.,*et al*…2005) أما بالنسبة لتقانة التمايز التي استخدمت في هذا البحث، فإنه يعد متطوراً عن تقانات التمايز المستخدمة في بحوث سابقة مثل تقانة التمايز التي استخدمها الباحث Mi ho,K.F. وزملائه (Miho.K.F.,*et al*…2007)

نستنتج من كل ذلك بأن وصف الطرق والإجراءات في هذا البحث تؤدي بالفعل إلى امتلاك فائدة جديرة بالاهتمام لكل من يعمل في مجال الخلايا الجذعية الجنينية، وكذلك هو يفيد لأجل تحاليل نمو الخلايا الجذعية الجنينية وسبل تمايزها إلى أنواع مختلفة من الخلايا (Smith, A.G., 1991) (Miho.K.F.,*et al*…2007)

المراجع

1-Avilion,A.,Nicolis,K.,Pevny,H.,Perez,L.,Vivian,N.,Lovell- Badge,R. 2003, Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function Genes Dev.,17, 126-140.

2_Chameres,I.,Colby,D.,Robertson,M.,Nichols,J.,Lee,S.,Tweedie,S.,Smith, A. 2003, Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.Cell,113, 643-655.

3-Conner,A.D. 2001, Mouse embryonic stem(ES) cell culture.CurrProtoc stem cell Biol.23, unit23.3.

4-Diny,Y.,Gan,Y.,Feng,B.,QI,H.,LI,M.,LI,SH. 2008, Efficient isolation inner cell mass from blastocysts by improved microsurgical technique.Cell research,18,
,s39.Furue,M.,Okamoto,T.,Hayashi,Y.,Ockochi,H.,Fujimoto,M.,Myoishi, Y.

5-Abe,T., Ohnuma, K., Sato, GH.Masashima,M.,Sato,JD.2005,Leukeamia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. In vitro cell Dev Biol Anim, 41(1-2),19-28.

6-HOFFMAN,L.M., and CARPENTER,M.K. 2005, Characterization and culture of human embryonic stem cells.Nature biotechnology,vol.23N6, 699-708.

7-Jackson,M.,Taylor,A.H.,Jones,E.A.,Forrester,L.M. 2010, The culture of mouse embryonic stem cells and formation of embryoid bodies. Method mol Biol,633, 1-18.

8_James,T.,Jennifer,K.,Thaddeus,G.,Maureen,D.,Charies,P.,Harris,B.,JOHN, H. 1995, Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Nat.Acad.Sci, vol92, 7844-7848.

9-Kazutoshi,T. and SHINY,Y. 2006, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell,126,663-676.

10_Miho,K.F., Jie,N., Jamie, P.J., Takamichi,M.,Kei, T.,Hirofami,S.,RYU-Ichiro,H.,Norio,N.,Testuji,J.,Denry,S.,Peter,A.2007, Development of difined medium for mouse, monkey and human ES cell culture. Life sciences,601-603.

11-Niwa,H.,Miyazaki,J.,Smith,A.G. 2000, Quantitative expression of OCT3/4 defines differentiation dedifferentiation or self-wenawal of ES cells. NatGent 24(4),372-6

12-Parmar,M. and LI,M2007 .Early specification of dopaminergic phenotype ES cell differentiation. Developmental Biology,7, 86.

13-QI-Long,Y.,Marios,S.,Dean,G.,Meng,L.,Austin,S. ,2003, Conversion of embryonic stem cell into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. Nature biotechnology,vol21,183-186.

14-Stvridis,MP.,Smith,A.G. 2003, Neural differentiation of mouse embryonic stem cells, Biochem Soc Trans,31, 45-9.

15-Smith,A.G. 1991, Culture and differentiation of embryonic stem cells. Tiss.cult.meth.13, 49-89.

16-Tremml,G.,Singer,M.,Malavarca,R. 2008, Cuture of mouse embryonic stem cells ,Curr protoc stem cell boil,1, unit1c.4.

17-Ulla-Montoya,F.,Verfaillie,C.,HU,W.S. 2005, Culture systems for pluripotent stem cells,Bioscibioene,100(1), 12-27.

18-Wiles,M.V. and Johansson,B.M. 1999, Embryonic stem cell development in a chemically defined medium, Expcell res. 25,247(1),241-8.
19-Wood,H.B. and EPISKOPU,V. 1999, Comparative expression of the mouse SOX1,SOX2 and SOX3 genes from progastrulation to early somite stages, Mech.der.(1-2),197-201.
20-YU,J.,Thomson,J.A. 2008, Pluripotent stem cell lines, Genes Dev. 1,22, 1987-97.
21-Yuin- Han,L., Qiang, W., JOON- Lin,C., Vinesenius,V., Weiwei,Z.,XI,C.,Guillaume,B.,Jashy,G.,Bernard,L.,Jun, L., Kee-Yew, W.,Ken,S., Charlie,L.,Xiuo-Dong,Z.,Kuo-Ping,C., Leonard,L., Viadimir,K., Paul,R., Lawrence,S.,Chia-Lin,W.,Yijun,R.,Bring,L.,Huck-HUI,N. 2006, The OCT4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells, Nature Genetics,38, 431-440..

CONSERVATION AND CULTIVATION OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS AND DEVELOP INTO NEURAL CELLS

Aumari, Amira
Dept. of Animal Biology-Faculty of Sciences-Damascus University-Syria

ABSTRACT

Embryonic stem cells have the amazing ability to differentiation into all types cell of the three germ layers, if a suitable environment for its, and it have great potential for tissue engineering application.

Embryonic stem cells, replacement therapy-cell therapy- is one of the most promising treatment for neurodegerative disease such as Parkinson`s disease. Cultured two cell line derived from the inner cell mass of murine blastocyst.

Cell line: 1- OCT4- GFP. 2- SOX1- GFP.

Cultured murine embryonic stem cells in DMEM medium or GMEM medium with leukaemia inhibitory factor (LIF),has also been cultured in these medium without LIF and added the differentiation factors for differentiation into neural cells. Cultured cells were peaceful , healthy and good, therefore some cells were then placed in liquid nitrogen, but at one stage cell were contaminated, contaminated cells were sterilized and discarded. Conservation and cultivation technology requires effort, hard work and full knowledge to keep the cells on their health , safety ,quality and thus the possibility for conservation that cells in culture and keep it in liquid nitrogen. The some applies to the possibility of differentiation into neural cells, after withdrawal inhibitory factor, has beensaid all the application for that, to in order to benefit every researcher, especially locally, in the area.

Keywords: Embryonic stem cells, culture, culture medium, differentiation medium, leukaemia inhibitory factor (LIF).

قام بتحكيم البحث

أ.د / محمد منصور قاسم — **كلية الزراعة – جامعة المنصورة**
أ.د / حسين عبدالله محمد الفضالى — **كلية الزراعة – جامعة المنصورة**