



جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة كيميائية حيوية وجزئية للخلايا الجذعية العصبية المعزولة

من دماغ أجنة الفئران البيض السويسرية *Mus musculus*

بيداء غانم محمد ابراهيم

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الاستاذ

الدكتور نشأت غالب مصطفى

الاستاذ المساعد

الدكتور علي اشكر عبد

٢٠٢٢م

١٤٤٣هـ

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية عزل وزراعة الخلايا الجذعية العصبية Neural Stem Cells (NSCs) من دماغ اجنة الفئران المهق من نوع *Mus musculus* بعمر (17E) يوما ودراسة نمو هذه الخلايا وشكلها الخارجي اذ تمت زراعتها في الوسط الزرعي DMEM/Ham's F12 مضافاً اليه عوامل النمو المتمثلة بعامل النمو البشري (rHuEGF) وعامل النمو الارومي الليفي (FGF-2) وتنميتها في حاضنة بدرجة 37م° و 5 % CO2 وبعد 24 ساعة ظهرت الخلايا الجذعية العصبية ذات الشكل الكروي اذ لوحظ ان نسبة النواة إلى الساييتوبلازم في هذه الخلايا عالية واطهرت الخلايا نشاطاً مرتفعاً في الانقسام والتكاثر. تجمعت هذه الخلايا لتكوين الكرية العصبية الاولية Primary neurosphere اذ لوحظ من البداية تجمع مجاميع صغيرة مكون من خليتين وثلاث خلايا واربع خلايا وهو دلالة على بداية تكوين الكرية العصبية Neurosphere بعدها تمت دراسة تأثير مركب dbcAMP والثايوفيلين على قابلية التمايز للخلايا الجذعية العصبية اذ تم اولاً قياس السمية الخلوية لهذه المركبات على بقاء وفعالية الخلايا الجذعية العصبية بإجراء اختبار MTT الذي أشارت نتائجه إلى عدم وجود سمية خلوية لمركب dbcAMP والثايوفيلين عند التراكيز النهائية المستخدمة على فعالية وحيوية خلايا NSCs .

بعدها تمت دراسة تأثير هذه المركبات في تمايز الخلايا الجذعية العصبية وذلك بتعريض المزارع الخلوية لمركب dbcAMP عند التراكيز (2,4,6,8) ملي مولار اذ لوحظ حدوث تمايز للخلايا الجذعية العصبية خلال 24 ساعة من المعاملة و ظهرت الخلايا احادية القطب مع وجود خلايا جذعية عصبية غير متميزة ومع استمرار النمو لوحظ بعد 48 ساعة وجود الخلايا ثنائية القطب فضلاً عن أحادية القطب مع وجود قليل من الخلايا العصبية غير المتميزة وبعد 72 ساعة لوحظت الخلايا العصبية متعددة الاقطاب فضلاً عن الأنواع الأخرى مع اختفاء الخلايا الجذعية العصبية غير المتميزة ولمعرفة تأثير هذا المركب على التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن بقاء حالة الجذعية وتعدد القدرات فقد تم قياس التعبير الجيني لجينات (Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc) باستخدام تقنية RT-PCR اذ لوحظ انخفاض في التعبير الجيني لهذه الجينات مما يشير إلى حدوث توافق ما بين التحول الشكلي والتغير في التعبير الجيني وهذا دلالة على حدوث التمايز في خلايا NSCs.

تمت ايضاً دراسة تأثير مركب الثايوفيلين في قابلية التمايز للخلايا الجذعية العصبية و لم تظهر النتائج وجود تأثير للثايوفيلين في قابلية التمايز للخلايا الجذعية العصبية وقد جاءت نتائج RT-PCR متوافقة مع التغير الشكلي اذ لم تظهر النتائج انخفاضاً في التعبير الجيني وحافظت

الخلايا على تعبيرها الجيني المرتفع مما يشير إلى عدم حدوث التمايز وان الثايوفلين لم يحفز تمايز الخلايا الجذعية العصبية في هذه الدراسة.

كما وتم دراسة التأثير التازري للـ dbcAMP والثايوفلين في تمايز الخلايا الجذعية العصبية وقد أظهرت النتائج ان معاملة الخلايا الجذعية العصبية بمزيج dbcAMP والثايوفلين أدى إلى تمايز الخلايا الجذعية العصبية خلال 12 ساعة ليؤكد حدوث تأثير تازري للمركبين معاً في تمايز الخلايا الجذعية العصبية وقد جاءت نتائجنا لتثبت إمكانية عزل الخلايا الجذعية العصبية من ادمغة اجنة الفئران وعدم وجود تأثير سمي لمركب dbcAMP والثايوفلين في الخلايا الجذعية العصبية عند التراكيز المستخدمة كذلك اظهرت النتائج ان مركب dbcAMP له تأثير تحفيزي في تمايز الخلايا الجذعية العصبية بينما لم يلاحظ وجود تأثير للثايوفلين على تمايز الخلايا فيما ظهر تأثير تازري للـ dbcAMP والثايوفلين في تمايز الخلايا الجذعية العصبية إلى الخلايا العصبية . وتعد هذه النتائج خطوة مهمة نحو فهم أعمق لألية تمايز الخلايا الجذعية العصبية ودور الاشارات الخلوية (cAMP) في بيولوجيا هذه الخلايا.

Abstract

The present study deal with the isolation and culture of the neural stem cells (NSCs) from the brain of 17-days-old mice (*Mus musculus*) embryos. In this study, neural stem cells were isolated from the brain of mice with an age of (17) days and investigated their growth and outer appearance morphology. These cells were cultured in **DMEM/Ham's F12** medium containing both **recombinant human epidermal growth factor (rHuEGF)** and **fibroblast growth factor-basic (FGF-2)** as growth factors and they were incubated at a temperature of 37 °C with the presence of 5% of carbon dioxide (CO₂). After 24 hours the neural stem spherical-shaped cells demonstrated, and it has the high ratio of the nucleus to the cytoplasm. Also, the cells showed high activity of multiplication. In addition, cells aggregated to form the primary neurosphere as a small group were gathered, which consists of two, three and four cells. This reveals the formation of the neurosphere. Then the effect of dbcAMP and theophylline on the NSCs differentiation were studied. The cytotoxicity of these compounds was first measured on the survival and the viability of the neural stem cells by conducting MTT test. The results indicated that dbcAMP and theophylline had no cytotoxicity at the concentrations used in this study. After that, the effect of these compounds on the differentiation of the neural stem cells was investigated by exposing the cultures to different concentrations (2, 4, 6 and 8) mM. The neural stem cells differentiation was observed within 24 hours of treatment and unipolar cells appeared with the presence of undifferentiated neural stem cells, and with continued growth bipolar in addition to unipolar and undifferentiated cells were noticed. After 72 hours, multi-polar cells and other type of cells were observed and the undifferentiated neural stem cells disappeared. However, to identify the effect of cAMP and theophylline on the gene expression of the (Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc) genes, RT-PCR based technique were employed. The

results showed a decrease in the gene expression of these genes corresponding with the morphological change and the change in gene expression. Also, the effect of the theophylline on the neural stem cells differentiation potential was also studied and the results showed that theophylline had no significant effects on the differentiation of the neural stem cell. The results of the RT-PCR were consistent with the morphological change as the results showed that cells maintained their high gene expression matching no differentiation had taken place. Moreover, the synergetic effect of both dbcAMP and theophylline on the neural stem cells differentiation was investigated. The results showed that treatment of the neural stem cells with a mixture of dbcAMP and theophylline led to cell differentiation within 12 hours confirming the occurrence of the synergetic effect of both compounds on the neural stem cells differentiation. It could be concluded that is possible to isolate the neural stem cells from the brains of mice and there is no cytotoxic effect of dbcAMP and theophylline on the neural stem cells at the concentrations used in study. Finally, our results put a key role step in comprehensive knowledge of the differentiation of the neural stem cells and the task of the cAMP in the biology of these cells.

**University of Mosul
College of Education
for Pure Science**



**A Biochemical and Molecular Study of the
Neurostem Cells Isolated from Swiss Mice
Embryos Brains *Mus musculus***

Baidaa Ghanem Mohammed Ibrahim

**Ph.D. Thesis
Biology**

Supervised by

**Assist. Prof.
Dr. Ali Ashgar Abd**

**Prof.
Dr. Nashaat Ghalib Mustafa**

2022 A.D

1443 A.H