

## МЕТОД ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ НЕЙРАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОТА

*Л. В. КЛАДНИЦЬКА, кандидат ветеринарних наук, доцент*

*А. Й. МАЗУРКЕВИЧ, доктор ветеринарних наук, професор*

*С. В. ВЕЛИЧКО, кандидат біологічних наук*

*Національний університет біоресурсів і природокористування  
України*

*E-mail: [kladlarisa@yandex.ru](mailto:kladlarisa@yandex.ru); [amaz@nauu.kiev.ua](mailto:amaz@nauu.kiev.ua)*

**Анотація.** Представлено методуку отримання нейральних стовбурових клітин (НСК). Первинним матеріалом служила нервова тканина головного мозку новонародженого кота, яку відбирали у стерильних умовах, тричі промивали фосфатно-буферним розчином. Первинний матеріал піддавали механічній дезагрегації до шматочків розміром 1-3 мм<sup>3</sup>, і розміщували у культуральних чашках. У культуральний посуд вносили середовище для культивування Ігла, модифіковане Дюльбекко (DMEM), 15-20 % фетальної сироватки бичків (FBS), 1 % антибіотика-антимікотика. Культуральні чашки з первинним матеріалом культивували за стандартних умов у CO<sub>2</sub> інкубаторі за температури 37° С, 5 % вмісті CO<sub>2</sub>. Кожні три доби середовище в культуральних чашках замінювали на свіже. Моношар НСК формувався на 10-14 добу культивування. Для зниження гетерогенності культури клітин проводили субкультивування 3-4 рази.

**Ключові слова:** *нейральні стовбурові клітини, нервова тканина, культивування, проліферація, кіт*

**Актуальність.** Нервова тканина ектодермального походження і є системою спеціалізованих структур, що утворюють основу нервової системи і забезпечують умови для реалізації її функцій. В умовах ушкодження нервової тканини в цілісному організмі виникають дуже серйозні порушення, які є причиною захворювань. Нейротрансплантація вже досить давно розглядається як перспективний підхід для корекції патологічного стану нервової системи.

На сьогоднішній день остаточно сформувалися уявлення про постійний нейрогенез в деяких ділянках мозку ссавців (субвентрикулярна зона бокового шлуночка, зубчаста звивина, гіпокамп), який забезпечується за рахунок пулу нейральних стовбурових клітин. Нейральні стовбурові клітини визначають як

клітини з необмеженим проліферативним потенціалом, здатні до самовідтворення і генерації мультипотентних нащадків, які надалі дадуть три основні гілки нейрального диференціювання: нейрони, астроцити та олігодендроцити.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Суттєвим кроком у вивченні нейральних стовбурових клітин стало їх виділення і культивування. В культурі *in vitro* стовбурові клітини активно розмножуються в умовах з ростовими факторами, формуючи вільно плаваючі колонії кулястої форми, які називаються нейросферами. Клонування нейросфер дало інструмент для встановлення властивості «стовбуровості» у тих або інших первинних популяцій нейральних клітин. Саме з допомогою цього підходу було продемонстровано, що деякі області розвивається і зрілого мозку ссавців, включаючи людину, містять пули нейральних стовбурових клітин.

Відомі сучасні методики отримання культури фетальних нейральних прогеніторних клітин з гіпокампа миші [1, 2, 3], зубчастої звивини [4, 5], за якими вилучали нервову тканину з гіпокампа ембріона миші, механічно подрібнювали, пропускали через клітинний фільтр, відмивали, нашаровували на перколл, знімали та відмивали клітини, вносили їх у культуральне середовище з фактором росту фібробластів для культивування у CO<sub>2</sub> інкубаторі, за вмісту CO<sub>2</sub> 5 %.

Недоліком даних способів є достатньо активний механічний (пропускання через клітинний фільтр, неодноразове промивання первинного матеріалу), та агресивний хімічний (застосування перколлу) вплив на клітини. Як наслідок, відбувається ушкодження нервових клітин, а також у первинний матеріал не потрапляє достатня кількість цитокінів та ростових факторів для забезпечення активної проліферації. Окрім того, ця методика передбачає додаткове застосування реактиву (фактора росту фібробластів), який має високу вартість, що призводить до збільшення вартості процедури отримання культури нейральних стовбурових клітин. Також процес виділення гіпокампа з головного мозку передбачає застосування додаткового устаткування, що в деяких випадках унеможлиблює використання вказаного способу.

**Мета дослідження** – визначення умов отримання стовбурових клітин із нервової тканини, що може бути використано для напрацювання біологічного матеріалу з метою подальшого його застосування.

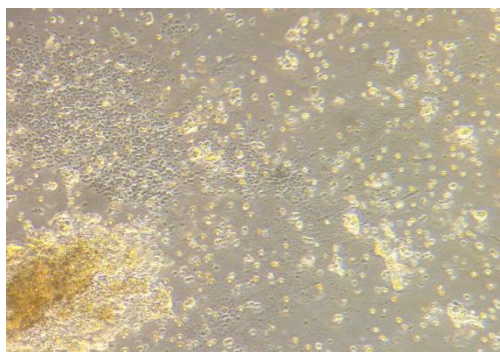
#### **Матеріали і методи досліджень.**

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.), «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.), а також з дотриманням усіх принципів біоетики та

норм біологічної безпеки. Досліди проводили на новонароджених котенятах.

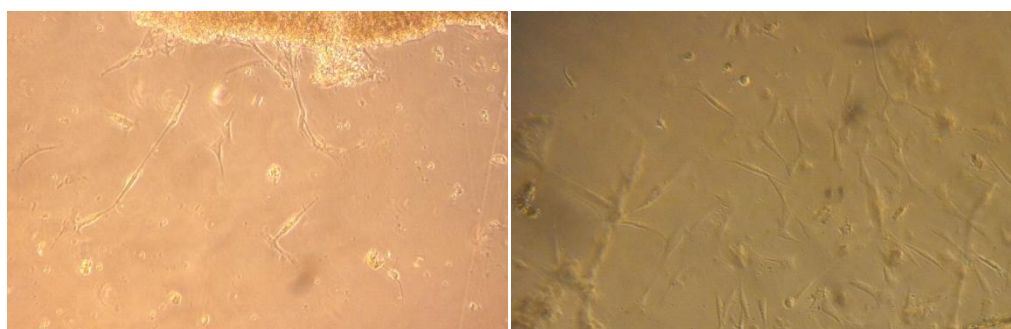
Дослідних тварин піддавали евтаназії шляхом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. Стерильно відбирали нервову тканину головного мозку, промивали фосфатно-буферним розчином декілька разів. Отримані фрагменти нервової тканини механічно подрібнювали на шматочки розміром 1-3 мм<sup>3</sup>, вносили їх у культуральні чашки, та культивували за стандартних умов [3]. Процес проліферації, формування колоній клітин здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss). При досягненні конфлюентності моношару 70-80 % клітин нервової тканини знімали з дна культурального посуду, фільтрували, промивали фосфатно-буферним розчином та проводили субкультивування 3-4-ри пасажі з метою зниження гетерогенності культури.

**Результати власних досліджень.** Первинний матеріал (нервова тканина) забезпечує накопичення у середовищі культивування цитокінів та факторів росту, необхідних для ефективного процесу проліферації клітин. Внаслідок культивування первинного матеріалу (рис.1) спостерігали прикріплення до дна культурального посуду спочатку поодиноких клітин.



**Рис.1.** Первинний матеріал (нервова тканина) у культуральному посуді

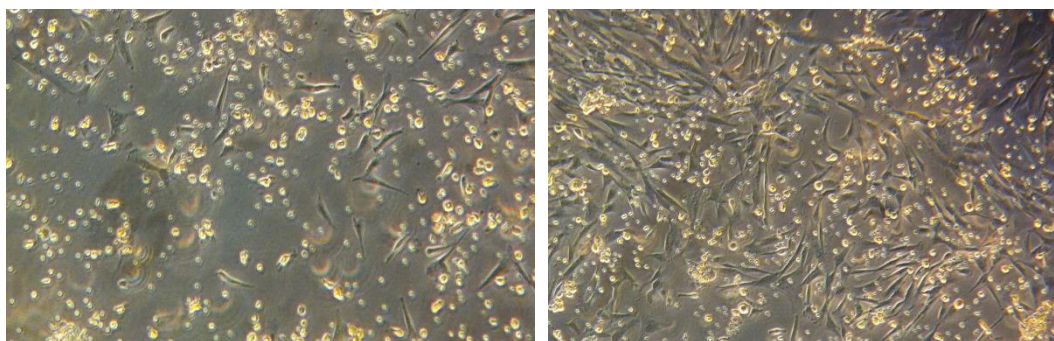
На 3-6 добу культивування було зафіксовано збільшення кількості прикріплених клітин до дна культурального посуду (рис.2).



## **Рис. 2. Прикріплення поодиноких клітин до дна культурального посуду x 200**

Кожну добу проводили візуалізацію прикріплення клітин до дна культурального посуду, їх проліферацію, формування колоній, а також контролювали середовище культивування у чашках та за необхідності його частково замінювали на свіже.

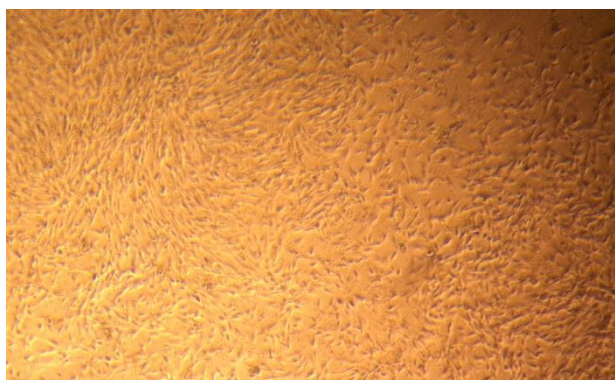
На 5-6 добу дослідження спостерігали формування колоній та активну проліферацію клітин з адгезивними властивостями (рис.3). Також на рисунку бачимо у середовищі неприкріплені клітини, які не володіють адгезивними властивостями. Первинна культура нервової тканини складається з морфологічно різних клітин, що пов'язано із різноманітністю вихідного спектра. У ході культивування відбувається поступова очистка культури від слабоадгезивних клітин, які не прикріплюються до дна культурального посуду.



**Рис. 3. Формування колоній, проліферація клітин, не адгезовані клітини у середовищі, x100**

Конфлюентність моношару адгезивної фракції клітин нервової тканини на 10-14-ту добу культивування сягала 70-80 % (рис.4).

Моношар клітин знімали з дна культурального посуду за допомогою розчину трипсину з етилендиметилтетраоцтовою кислотою і пересаджували у більший за розміром та проводили субкультивування 3-4 пасажі з метою зниження гетерогенності культури клітин.



#### **Рис. 4. Моношар клітин нервової тканини, x100**

Таким чином, застосування запропонованого методу забезпечує отримання культури нейтральних стовбурових клітин із нервової тканини kota. Завдяки цьому методу вдається уникнути пошкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту та забезпечити їх надходження з фрагментів нервової тканини у середовище і тим створити необхідну концентрацію, що має вирішальне значення для проліферації, особливо у первинній культурі, та здешевити процедуру їх отримання.

#### **Висновки і перспективи подальших досліджень.**

1. Нервову тканину головного мозку новонародженого kota можна використовувати у якості первинного матеріалу для отримання культури нейтральних стовбурових клітин.

2. Нервову тканину головного мозку піддавали механічній дезагрегації без застосування ферментативної обробки. Первинний матеріал культивували за стандартних умов у CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Моношар клітин формувався на 10-14 добу культивування.

3. Для зниження гетерогенності культури клітин проводили субкультивування культури 3-4 рази.

У перспективі планується провести імуноцитохімічні дослідження культури нейтральних клітин, отриманих вказаним методом, на якісний і кількісний вміст білків.

#### **Список використаних джерел**

1. Yan , Ho Chan. Are newborn rat-derived neural stem cells more sensitive to lead neurotoxicity / Ho Chan Yan , Mingyong Gao Wutian Wu // *Neural Regen Res.* 2013 Mar 5; 8(7): 581–592. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.07.001 PMID: PMC4145982.

2. Цупиков, О. М. Метод отримання культури фетальних нейтральних прогеніторних клітин з гіпокампа мишей./ О.М. Цупиков // *Клітинна та органна трансплантологія.* – 2014. – Том 2, № 2. – С.152-154.

3. Мазуркевич, А. Й. Оптимальні умови виділення та культивування адгезивної фракції моноклеарних клітин кісткового мозку миші./ А. Й. Мазуркевич, Л. В. Кладницька, В. В. Ковпак // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка .* – 2013. – Том 2(64) – С.41-43

4. Babu, H.A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus / J. H. Claasen, S. Kannan // *Front. Neurosci.* – 2011. – Vol. 5, article 89.

5. Ming, G. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions / G. L. Ming, H. Song // *Neuron.* – 2011. – Vol. 70, № 4. – P. 687–702.

## References

1. Yan , Ho Chan. (2013). Are newborn rat-derived neural stem cells more sensitive to lead neurotoxicity / Ho Chan Yan , Mingyong Gao Wutian Wu // Neural Regen Res. 2013 Mar 5; 8(7): 581–592. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.07.001 PMID: PMC4145982.
2. Tsupikov, O. (20). The method of obtaining neural fetal progenitor cells culture from the hippocampus of mice. / A.M. Tsupikoff //Cell and organ transplantation, Volume 2, № 2, 152-154.
3. Mazurkevych, A., Kladnytska, L.V., Kovpak V.V. (2013). Optimal conditions of isolation and cultivation of adhesion fraction of mononuclear bone marrow cells of mice. Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko University, Volume 2 (64), 41-43
4. Babu, H.A., Claasen, J.H., Kannan S. (2011) . Protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. Front. Neurosci., Vol. 5, article 89
5. Ming, G., Song H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions . Neuron, Vol. 70, № 4, 687–702.

## МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОТА

*Л. В. Кладницкая, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко*

**Аннотация.** *Представлена методика получения нейральных стволовых клеток (НСК). Первичным материалом служила нервная ткань головного мозга новорожденного кота, которую отбирали в стерильных условиях, трижды промывали фосфатно-буферным раствором. Первичный материал подвергали механической дезагрегации до кусочков размером 1-3 мм<sup>3</sup>, и размещали в культуральных чашках. В культуральную посуду вносили среду для культивирования Игла, модифицированную Дюльбекко (DMEM), 15-20 % фетальной сыворотки бычков (FBS), 1 % антибиотика-антимикотика. Культуральные чашки с первичным материалом культивировали в стандартных условиях в CO<sub>2</sub> инкубаторе при температуре 37° С, 5 % содержания CO<sub>2</sub>. Каждые трое суток среду в культуральных чашках заменяли на свежую. Монослой НСК формировался на 10-14 сутки культивирования. Для снижения гетерогенности культуры проводили субкультивированием 3-4 раза.*

**Ключевые слова:** *нейральные стволовые клетки, нервная ткань, культивирование, пролиферация, кот*

## THE METHOD OF OBTAINING THE CULTURE OF NEURAL STEM CELLS OF CAT

*L. Kladnytska, A. Mazurkevych, S. Velychko*

**Abstract.** *The article presents the method of obtaining the culture neural stem cells (NSCs) from cat nervous tissue. We used explants method*

*in our modification for obtaining NSCs from cat's nervous tissue. We are taken nervous tissue in the sterile conditions in cat age 1 day. It was the material of explants. Nervous tissue washed three times with phosphate buffer solution and transferred into another sterile laboratory dishes. The original material was subjected to mechanical disaggregation in pieces size of 1-3 mm<sup>3</sup> and placed in culture dishes. We used Igle medium, modified Dulbekko (DMEM) with 15-20 % fetal bovine serum (FBS), 1 % antibiotic-antimycotic, with 5% CO<sub>2</sub>. for cells cultivation. Cultural cups with explants (neironal tissue) were cultured under standard conditions in a CO<sub>2</sub> incubator at a temperature 37o C. MSC monolayer formed on the 10-14-th day of cultivation. To reduce the heterogeneity of cell culture performed subcultivation 3- 4 times.*

**Key words: neural stem cells, neural tissue, cultivation, proliferation, cat**