



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 58192

(13) A

(51) 7 C 12 N 5 / 08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ

1

2

(21) 2002108435

(22) 24 10 2002

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. № 7, 2003 р.

(72) Грищенко Валентин Іванович, Гольцев Ана-
толій Миколаєвич, Бабенко Наталя Миколаївна,
Дубрава Тетяна Георгіївна(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

(57) Спосіб культивування ембріональної нервової
тканини шляхом інкубації у стандартному живиль-
ному середовищі при 37°C, який відрізняється
тим, що додатково використовують живильне се-
редовище, яке являє собою агаровий гель, що
містить гомогенат м'яких оболонок мозку ембріонів
людини

Винахід належить до експериментальної біо-
логії, зокрема морфології, патоморфології фізіоло-
гії та патофізіології, і може бути використаний для
оцінки морфологічної та функціональної повноцін-
ності тканин ЦНС з метою їх подальшої транспла-
нтації.

Відомо кілька методів культивування ембрі-
ональної нервової тканини (ЕНТ) органотипічне,
культивування в умовах шарової культури та куль-
тивування реагрегатів [1].

Найбільш близьким до способу, що заявляється
є спосіб органотипічного культивування експла-
нтатів закладених кори великих півкуль головного
мозку ембріонів людини на колагеновому субстра-
ті [2]. У цьому випадку на знежирені покривні скел-
ця, розташовані у стерильних чашках Петрі,
наносять одну-дві краплі діалізованого колагену та
рівномірно розподіляють по поверхні скла. На
кожне скло у культуральній посудині поміщають
експлантати та наносять 1 - 2 краплі стандартного
живильного середовища, яке містить 15% ембрі-
ональної телячої сироватки, 60% повного середо-
вища ДМЕМ, 20% соповового розчину Хенкса з до-
даванням інсуліну, глюкози та антибіотиків та L-
глутаміну. Зміну середовища здійснюють двічі на
тиждень.

Основним недоліком цього способу є обмеже-
ний строк культивування (21 доба), внаслідок чого
клітини ЕНТ не реалізують свої морфогенетичні
потенції у повному обсязі. Це можна пояснити від-
сутністю у стандартному живильному середовищі
специфічних ростових факторів (фактор росту
фібробластів, нейротрофічний та епідермальний

фактори росту).

В основу винаходу поставлена задача створи-
ти такий спосіб культивування ЕНТ, у якому би
використання модифікованого живильного сере-
довища, яке має біостимулюючу дію, дозволило
подовжити строк культивування.

Ця задача вирішується тим, що у способі куль-
тивування ЕНТ шляхом інкубації у стандартному
живильному середовищі при 37°C додатково вико-
ристовують живильне середовище, яке являє со-
бою агаровий гель, що містить гомогенат м'яких
оболонок мозку ембріонів людини.

Агаровий гель має трьохмірну структуру та
оточує культивувану тканину, що дозволяє експла-
нтатам уникнути ризику видалення під час зміни
середовища. Гомогенат м'яких оболонок ембрі-
онального мозку містить низку ополук, які мають
нейритетимуючі та мітогенні властивості [3],
тому використання живильного середовища, яке
містить гомогенат м'яких оболонок мозку ембріонів
людини дозволяє подовжити строк культивування
у порівнянні з прототипом майже на 2 тижні, тоб-
то до 35 діб, що створює умови реалізації бласт-
ними формами клітин своїх морфогенетичних по-
тенцій з виявленням явищ мієлінізації на 21 добу.

Спосіб пояснюється таким прикладом.

В асептичних умовах готували гомогенат м'я-
ких оболонок мозку ембріонів людини 12 тижнів
гестації, одержаних при штучному аборті. Для цьо-
го відокремлені оболонки мозку переносили до
скляного гомогенізатора Потера з 0,5 - 1,0 мл роз-
чину Хенкса та товчком обережно роздаювали
фрагменти до одержання однорідної маси. Одер-

(13) A

(11) 58192

(19) UA

жану суспензію пропускали крізь пристрій для переливання крові та кровозамінників (ПК-11-03), а потім крізь ін'єкційні голки діаметру, що зменшується.

Далі розпочинали приготування модифікованого живильного середовища. Для цього 8 часток попередньо підігрітого до 40°C стандартного живильного середовища змішували з 1 часткою гарячого 5,5%-ного бактоагару ("Difco"), витримували на водяній бані при 40°C та додавали 1 частку гомогената м'яких оболонок мозку ембріонів людини 12 тижнів гестації. Кінцева концентрація клітин у модифікованому живильному середовищі складала $1 - 1,5 \cdot 10^6$ клітин/мл, а агару 0,55%.

Суміш агарового середовища з клітинами розливали по 1,5 мл у одноразові пластикові чашки Петрі та залишали при кімнатній температурі для застигання.

Чашки Петрі з модифікованим живильним середовищем розташовували у стандартних умовах культивування (37°C, 7,5% CO₂, 100% вологість) та витримували 7 діб для "достигання" клітин.

Безпосередньо в день експерименту в стерильних умовах мозок ембріонів людини потрібного строку гестації розрізали на кілька фрагментів розміром 1 - 3 мм. Експлантати розташовували на застиглий шар модифікованого живильного середовища та покривали 1 мл стандартного живильного середовища, що містило 15% ембріональної телячої сироватки, 60% повного середовища DMEM, 20% сольового розчину Хенкса з додаванням інсуліну, глюкози, антибіотиків та L-глутаміну. Кінцева концентрація агару у верхньому шарі складала 3,3%. Культивування проводили в стандартних умовах.

Перегляд та приготування постійних препаратів проводили на 7, 14, 21, 30 та 35 добу культивування. З метою обліку змін клітин у культурі використовували прижиттєву світлову й фазово-контрасну мікроскопію та аналіз пофарбованих препаратів. Фарбування агарових дисків проводили азур-еозин за Романовським, суправтально

метиловим синім, крезиловим фіолетовим за Нісслем та судаковим чорним.

Розвиток експлантатів при культивуванні ЕНТ у двошаровій агаровій культурі проходило відповідно із закономірностями, встановленими для тканинних культур. Загальний строк культивування складав 35 діб з вираженими явищами мієлінізації на 21 добу. Відзначено особливий тип росту нейротканини у крайових зонах експлантату, який спостерігався на другому тижні культивування як "ланцюжки" мігруючих елементів. Численні "ланцюжки" клітин є способом міграції нервових клітин, що не залежить від радіальної глії. Згідно з даними літератури, подібним шляхом нейрональні попередники мігрують з ростральної субвентрикулярної зони в зону нюхової луковичи [4]. Вважають, що ці клітини використовують партнерів як міграційний субстрат.

Таким чином, агарова культура з живильним шаром, який містить гомогенат м'яких оболонок мозку ембріонів людини, є адекватною довгостроковою моделлю для дослідження поведінки клітин мозку людини у культурі.

Джерела інформації

1. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. - М. Наука, - 1988. - с. 318.

2. Бобрышев Ю. В., Балабанов Ю. В., Павлов О. В. и др. Электронно-микроскопическое исследование развития нейронов в органотипических культурах закладки коры головного мозга эмбриона человека. Цитология, 1989, №12, С. 1453 - 1457.

3. Цимбалюк В. І., Васильєва І. Г., Олексенко Н. П. та інші. Вплив екстракту фетальної нервової тканини на вміст гаммааміномасляної кислоти у культурі нервових клітин. Трансплантологія, 2001, том 2, №1, С. 70 - 73.

4. Doetsch F., Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol. 93, №25, 14895 - 4900.