



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71388 (13) A

(51) 7 C12N5/00, C12N1/36

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ СУСПЕНЗІЇ СТОVBУРОВИХ НЕЙРАЛЬНИХ КЛІТИН

1

2

(21) 20031212602

(22) 26.12.2003

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Зозуля Юрій Панасович, Лісяний Микола Іванович, Любич Лариса Дмитрівна

(73) ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ ІМЕНІ АКАДЕМІКА А. П. РОМОДАНОВА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання збагаченої суспензії стовбурових нейральних клітин, що включає виділення

клітин з ембріональної або неонатальної мозкової тканини, збагачення культуральної суспензії і на-
рощування кількості клітин, який **відрізняється**
тим, що збагачення суспензії стовбуровими ней-
ральними клітинами досягають шляхом культиву-
вання вихідної клітинної суспензії у збідненому
безсироватковому середовищі ДМЕМ, а нарос-
тування кількості клітин досягають додаванням ре-
тинолу ацетату.

Винахід стосується біології, а саме цитології (культури клітин) та суміжних дисциплін: нейробіології, нейрофізіології, і може бути застосований у медицині з метою лікування неврологічної та нейрохірургічної патології.

Розроблено кілька способів отримання регіонарних стовбурових клітин нервової тканини у культурі клітин [1-4, 6, 7]. Загальний принцип полягає в тому, що при додаванні ростових факторів у культуру клітин головного мозку відбувається поділ стовбурових клітин. Так, було виділено плюрипотентні нейрональні клітини з головного і спинного мозку ембріона людини: клітини культивували у безсироватковому середовищі із додаванням факторів росту FGFR, LIF і EGF, в результаті чого була отримана лінія нейральних клітин, яка культивувалась *in vitro* протягом 1 року і диференціювалась у нейрони, астроцити та олігодендроцити [2, 5]. Клітини, виділені з ембріональної, неонатальної і зрілої ЦНС гризунів, проліферували у відповідь на EGF і FGF-2, зберігаючи здатність диференціюватися у нейрони та глію [4].

Найбільш близьким до декларованого нами способу і обраного нами за прототип є спосіб Ben-Hur T. et al. (1998) [3]. Автори механічно відділяли стріатум і епендиму головного мозку новонароджених щурів (1 дня). Тканину подрібнювали, переносили у середовище ДМЕМ/P12 (1:1, Life Technology) і суспендували. Життєздатні клітини у кількості 1×10^5 переносили у культуральні флаки (Costar) у 20мл середовища ДМЕМ/P12 із додаванням B27, 25мкг/мл бичачого інсуліну, 100мкг/мл

трансферину, 20нМ прогестерону, 60мкМ путресцину, 30нМ селеніту натрію, 20нг/мл EGF або 10нг/мл FGF-2. Кожних 3 дні половина культурального середовища оновлювалась. Через тиждень авторами було отримано чисельні кластери нейральних стовбурових клітин.

Згадані способи отримання регіонарних стовбурових клітин нервової тканини у культурі клітин [1-4, 6, 7], а також спосіб Ben-Hur T. et al. (1998) [3] потребують, з одного боку, використання високоочищених реагентів і рекомбінантних ростових факторів іноземного виробництва, а з іншого - високотехнологічного устаткування, що диктує високий кошторис таких досліджень і унеможливорює широке застосування таких способів у клініці.

Завданням винаходу було створення способу отримання стовбурових нейральних клітин, який не вимагав би застосування ростових факторів, отриманих за рекомбінантною технологією, та специфічного обладнання, а також був відносно економічним, малозатратним і широкодоступним.

Поставлене завдання було вирішене завдяки тому, що у способі отримання збагаченої суспензії стовбурових нейральних клітин, який включає виділення клітин з ембріональної або неонатальної мозкової тканини, збагачення культуральної суспензії і наросування кількості клітин, досягають збагачення суспензії стовбуровими нейральними клітинами шляхом культивування вихідної клітинної суспензії у збідненому без сироватковому середовищі ДМЕМ, а наросування кількості клітин досягають додаванням ретинола ацетату.

(13) A

(11) 71388

(19) UA

Спосіб відтворюють наступним чином: в стерильних умовах нативну мозкову тканину (ембріональну або неонатальну) переносять у фізіологічний розчин, звільняють від оболонок, переносять у середовище ДМЕМ і суспендують шприцом з товстою голкою. Дають відстоятись 3хв і надосад переносять у скляні пеніцилінові флакони у кількості 2×10^6 клітин в 1мл. Кожних 3 дні половину культурального середовища оновлюють. На 4-5 добу від початку культивування в культуральне середовище додають ретинола ацетат (0,2мг/мл, АО "Київський вітамінний завод").

Застосування культивування клітин у збідненому безсироватковому середовищі ДМЕМ і при додаванні ретинола ацетату супроводжувалось наступною кінетикою суспензійних культур попередників нейроклітин (рис.1). При культивуванні клітин у безсироватковому середовищі ДМЕМ відбувалось зниження кількості клітин: у 1,5-2 рази на 5-7-у добу, в 3-4 рази - на 9-у добу. Кількість клітин продовжувала знижуватись до кінця спостереження (21 доба). Навпаки, при культивуванні клітин у середовищі ДМЕМ+ретинола ацетат, котрий вводили у поживне середовище на 5-у добу, значного зниження кількості клітин в культурі не відбувалось, їх кількість починала зростати з 7 дня культивування і збільшувалась на 9-12 день культивування в 2 і більше разів, досягаючи початкової кількості клітин. Таким чином, додавання в культивувальне середовище ретинола ацетату сприяло виживанню і розмноженню клітин.

Динаміка суспензійної культури нейроклітин у безсироватковому середовищі ДМЕМ і при додаванні ретинола ацетату наведена на рис.1.

Тривале спостереження за культивуванням *in vitro* нейроклітин з різних джерел (ембріональний мозок щура, кроля, людини, неонатальний мозок щура) показало, що на 9-у добу культивування у безсироватковому середовищі ДМЕМ відбувається зниження кількості клітин в 3-4 рази, що свідчить про те, що до цього терміну всі диференційовані

клітини гинуть, а залишаються переважно тільки життєздатні переживаючі малодиференційовані або недиференційовані клітини, що належать до прогеніторних і стовбурових нейральних клітин. Додавання в культивувальне середовище ретинола ацетату стимулює проліферацію клітин-попередників і стовбурових клітин; відбувається зростання кількості клітин у 2-5 разів. Клітини, отримані зазначеним способом, зберігають свою поліпотентність і здатність до диференціювання *in vitro* у нейробласти і гліальні клітини.

Література:

1. Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. Анализ развития стволовых нейральных клеток человека *in vitro* // Цитология. Cytology. - 2001. - Т.43, №9. - С.884-885.
2. Barami K., Zhao J., Diaz F.G., Lyman W.D. Comparison of neural precursor cell fate in second trimester human brain and spinal cord // *Neurol. Res.* - 2000. - 23(2-3). - P.260-6.
3. Ben-Hur T., Rogister B., Murray K. et al. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain // *J. of Neuroscience.* - 1998. - 18(15):5777-5788.
4. Caldwell M.A., He X., Wilkie N. et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres // *Nat.Biotech.* - 2001. - 19(5). - P.475-9.
5. Carpenter M.K., Cui X., Hu Z.Y. et al. *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells // *Exp.Neurol.* - 1999. - V.158, N.2. - P.265-278.
6. Ciccolini F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development // *Mol. Cell Neurosci.* - 2001. - 17(5). - P.895-907.
7. Johe R.R., Hazel T.G., Muller T. et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system // *genes and development* - 1996. - 10:3129-3140.

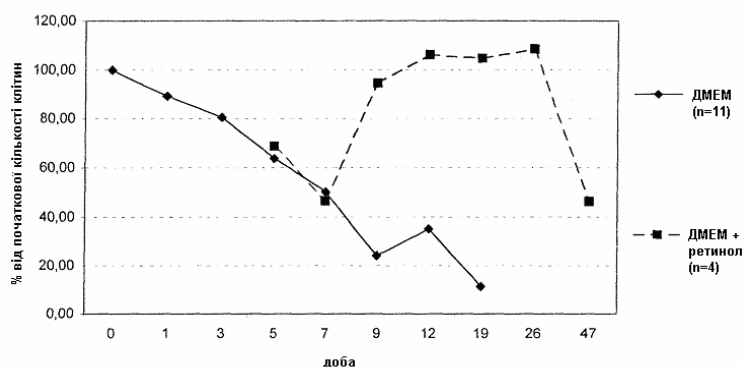


Рис. 1
Динаміка суспензійної культури нейроклітин у безсироватковому середовищі ДМЕМ і при додаванні ретинола ацетату