

УДК 591.398



Цушиков О. М.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна
 ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України»,
 Київ, Україна

e-mail: oleg_tsupikov@mail.ru

МЕТОД ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ ФЕТАЛЬНИХ НЕЙРАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН З ГІПОКАМПА МИШЕЙ

РЕЗЮМЕ

Культура нейральних стовбурових/прогеніторних клітин широко застосовується для вивчення характеристик цих клітин в контрольованих умовах *in vitro*, а також для дослідження клітинних і молекулярних механізмів розвитку захворювань центральної нервової системи та розробки стратегій їх лікування.

У даній роботі надається детальний протокол отримання фракції фетальних (E17-18) нейральних прогеніторних клітин (НПК) гіпокампа миші. Методика ґрунтується на використанні центрифугування суспензії гіпокампальних клітин у градієнті щільності перколу для отримання очищеної фракції НПК. Клітини культивуються у безсироватковому середовищі у вигляді моношару, що створює умови для більш рівномірного доступу мітогену *FGF-2* до клітин. Цей метод дозволяє отримати гомогенну популяцію недиференційованих прогеніторних клітин з фетального гіпокампа миші.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нейральні прогенітори; культура нейральних клітин; гіпокамп

Відкриття нейральних стовбурових/прогеніторних клітин є одним з найвидатніших досягнень в галузі нейробіології. Останнім часом все більше підтверджуються дані про постійний нейрогенез в певних ділянках мозку ссавців, який забезпечується за рахунок пулу стовбурових клітин [1, 2]. Суттєвим кроком у дослідженні нейральних прогеніторних клітин стало їх виділення і культивування. Культура НПК є потужним інструментом для розкриття молекулярних і клітинних механізмів у галузі нейробіології.

Важливою властивістю НПК є здатність підтримувати проліферативну активність в умовах *in vitro*, що дозволяє нарощувати їх кількість в культурі. Хоча велика увага приділяється потенційному використанню НПК в клітинній терапії, культивування нейральних прогеніторів може бути також важливим для дослідження механізмів нейрогенезу в контрольованих умовах *in vitro* [3].

Нейральні прогеніторні клітини спочатку культивували як вільноплаваючі кулеподібні колонії (так звані нейросфери) у безсироватковому середовищі з додаванням різних ростових факторів, наприклад, епідермального фактора росту (EGF) [4]. Клонування нейросфер дало інструмент для встановлення властивості «стовбуровості» у тих чи інших первинних популяціях нейральних прогеніторних клітин. Саме за допомогою цього підходу було продемонстровано,

що деякі ділянки мозку, який розвивається, і зрілого мозку ссавців, у тому числі людини, містять пули нейральних стовбурових клітин [5-7]. Пізніше НПК почали вирощувати в моношарових культурах із використанням фактора росту фібробластів типу 2 (FGF-2) [8, 9].

Моношарова адгезивна культура нейральних прогеніторів має кілька переваг порівняно із нейросферами. Така культура є однорідною популяцією недиференційованих прогеніторних клітин [10]. Клітини в адгезивній культурі можна легко моніторити, оцінювати морфологію й поведінку кожної клітини. Саме тому моношар НПК – це потенційне джерело для трансплантації клітин і корисна модель для дослідження процесів міграції та диференціації клітин.

Раніше вже були розроблені протоколи культивування нейральних прогеніторів з субвентрикулярної зони бокових шлуночків щура у вигляді моношару [9]. Актуальним завданням є отримання адгезивної культури нейральних прогеніторних клітин з фетального гіпокампа миші.

У даній роботі представлено розроблений протокол отримання очищеної фракції нейральних прогеніторних клітин з фетального (ембріони 17-го, 18-го дня розвитку – E17-18) гіпокампа миші та культивування їх у вигляді моношару у безсироватковому середовищі з додаванням *FGF-2*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ І РЕАГЕНТИ

№	НАЗВА	ФІРМА-ВИРОБНИК, КАТАЛОЖНИЙ НОМЕР
1	Neurobasal medium	Invitrogen, 21103-049
2	B27 supplement	Invitrogen, 17504-044
3	GlutaMAX	Invitrogen, 35050-038
4	Na pyruvate	Sigma, P2256
5	N-Acetyl-L-cysteine	Sigma, A9165
6	PenStrep	Gibco, 15140-122
7	фактор росту фібробластів FGF-2	Sigma, F0291
8	Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Sigma, H4641
9	Percoll	GE Health Care BioScience, 17-0891-01
10	Matrigel	BD Biosciences, 354234
11	PBS (phosphate buffered saline)	Gibco, 10010031
12	клітинний фільтр (40 мкм)	BD Falcon, 352340
13	скляні піпетки Пастера	Sigma, S6268
14	чашки Петрі діаметром 35 і 60 мм	Sigma, Z707651, Z707678
15	конічні центрифужні пробірки об'ємом 15 та 50 мл	BD Biosciences, 352097, 352070

СКЛАД СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ (НА 100 МЛ)

Neurobasal medium	96,3 мл
B27 supplement	2 мл
GlutaMAX	1 мл
Na pyruvate	100 мкл
N-Acetyl-L-cysteine	100 мкл
PenStrep	500 мкл

ПРИГОТУВАННЯ 22%-НОГО РОЗЧИНУ PERCOLL, ОБ'ЄМ 10 МЛ

У 15-мл пробірку додати 7,8 мл PBS і 2,2 мл 100%-ного розчину Percoll. Ретельно перемішати отриманий розчин.

ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ MATRIGEL ДЛЯ ПОКРИТТЯ ЧАШОК ПЕТРІ

Для покриття 10 чашок Петрі діаметром 35-мм матриксом Matrigel потрібно приготувати 20 мл розчину Matrigel (по 2 мл в кожну чашку). У пробірку об'ємом 50 мл налити 20 мл середовища Neurobasal

і додати 40 мкл 100%-ного розчину Matrigel. Ретельно перемішати отриманий розчин, наповнити ним 35-мм чашки Петрі і залишити при кімнатній температурі не менше години (поки виділяються клітини). Перед посадкою клітин чашки Петрі двічі відмивають від Matrigel середовищем Neurobasal.

ПРОТОКОЛ

- Усі етапи виконуються в охолоджених розчинах, чашки Петрі розташовуються на льоду.
- Наповнити три 60-мм чашки Петрі по 5 мл у кожну і одну 35-мм чашку Петрі – 1 мл охолодженого розчину HBSS та розмістити їх на льоду.
- Мишу на 17-ту, 18-ту добу вагітності піддають евтаназії шляхом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. Обробити шкіру черевної поверхні 70%-ним етанолом і зробити поперечний розріз довжиною 0,5 см на рівні пупка. Захопивши шкіру вище і нижче розрізу, потягнути шкіру убик голови і хвоста, щоб викрити доступ до черевної порожнини.
- Іншими стерильними ножицями зробити розріз очеревини, відпрепарувати матку разом з ембріонами і перенести у 60-мм чашку Петрі, наповнену 5 мл охолодженого розчину HBSS.
- Розрізати матку, дістати усі ембріони і перенести їх у другу 60-мм чашку Петрі з 5 мл охолодженого розчину HBSS.
- Утримуючи ембріон пінцетом за шию, вставити кінець вигнутого пінцета трохи вище носа, просунути його під череп, провести ним до задньої частини голови, розрізаючи таким чином череп і шкіру. Цим же пінцетом розвести шкіру разом з черепом і акуратно завести бранші під мозок, звести їх вниз і підняти разом із мозком. Перенести мозок у третю 60-мм чашку Петрі, наповнену 5 мл охолодженого розчину HBSS.
- Повторити пункт 6 для усіх ембріонів.
- Розрізати мозок навпіл за допомогою скальпеля, зробивши сагітальний розріз по серединній лінії. З кожної півкулі під стереомікроскопом вирізати гіпокамп і перенести в 35-мм чашку Петрі, наповнену 1 мл охолодженого розчину HBSS.
- Повторити пункт 8 для усіх макропрепаратів мозку.
- Подрібнити гіпокампи за допомогою мікроножиць у розчині HBSS.
- За допомогою трьох скляних піпеток Пастера різного діаметра (від більшого до меншого) розпіпетувати шматки гіпокамлів до однорідної суспензії. Піпетувати тканину необхідно повільно і обережно, щоб мінімізувати пошкодження клітин.
- Отриману суспензію клітин пропустити через клітинний фільтр з діаметром пор 40 мкм у 15-мл центрифужну пробірку.
- Додати у пробірку HBSS до 10 мл.
- Відцентрифугувати суспензію клітин у розчині HBSS при 240 г протягом 10 хв.
- Злити супернатант і до осаду додати 1 мл PBS. Обережно розпіпетувати осад з клітинами.
- Додати 10 мл 22%-ного розчину Percoll у 15-мл пробірку і відцентрифугувати при 540 г протягом 10 хв.
- У пробірку з Percoll акуратно нашарувати зверху 1 мл суспензії клітин.
- Відцентрифугувати суспензію клітин при 540 г протягом 10 хв.
- Зібрати супернатант і додати до осаду 1 мл середовища Neurobasal і розпіпетувати осад з клітинами.
- Відцентрифугувати суспензію клітин при 240 г протягом 10 хв.
- Повторити пункти 19-20.

22. Зібрати супернатант і додати до осаду 2 мл середовища для культивування, розпіпетувати осад з клітинами і підрахувати кількість клітин.
23. На одну 35-мм чашку Петрі (у 2 мл середовища) висаджують $3 \cdot 10^5$ клітин. Підрахувавши загальну кількість отриманих клітин у суспензії, розрахувати необхідну кількість чашок Петрі і, відповідно, загальний об'єм середовища для культивування.
24. У середовище для культивування додати фактор росту фібробластів (*FGF-2*) із розрахунку 20 нг на 1 мл середовища і ретельно перемішати.
25. Додати в отримане середовище для культивування 2 мл суспензії клітин.
26. У промиті після *Matrigel* чашки Петрі розлити суспензію клітин по 2 мл у кожен чашку.
27. Культивувати клітини в CO_2 -інкубаторі при температурі $+37^\circ\text{C}$ і 5% CO_2 . Середовище для культивування змінювати кожні 3 дні.

ІМУНОЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КУЛЬТУРИ НПК

Для аналізу фенотипу НПК свіжоізолювані клітини висівали на покривні скельця, покриті *Matrigel* ($4 \cdot 10^5$ клітин на 35-мм культуральну чашку). На 3-тю добу культивування культуральне середовище замінювали охолодженим 4%-ним розчином параформальдегіду (ПФ) і після фіксації протягом години проводили імуноцитохімічне фарбування культури клітин. Клітини інкубували з первинним моноклональним мишачим антитілом до нестину (*Chemicon*, USA) у розчині 0.1 М ФБ із додаванням 0,5% БСА та 0,3% Тритон X-100 протягом 12 годин при $+4^\circ\text{C}$. Первинне антитіло візуалізували вторинним антимишачим антитілом, кон'югованим з флуорохромом *AlexaFluor488* (*Invitrogen*, США). Ядра клітин контрастували флуоресцентним барвником *Hoechst33342* (*Invitrogen*, USA). Пофарбовану культуру клітин досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа *Fluoview-FX1000-BX61WI* (*Olympus*, Японія).

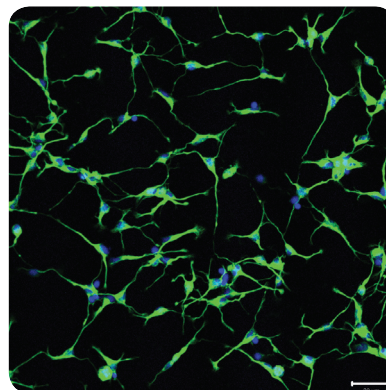


Рис. 1. Конфокальна мікрофотографія культури нейральних прогеніторів. Більшість клітин імунопозитивні на нестин (зелений колір). Ядра контрастовані *Hoechst 33342* (синій колір). Шкала – 20 мкм.

На третю добу культивування гіпокампульні нейральні прогенітори мали переважно округлу або біполярну форму і тонкі відростки. Імуноцитохімічний аналіз показав, що незначна кількість клітин (до 4,8%) експресувала маркери зрілих нейронів (бета-тубулін) або астроцитів *GFAP* (дані не показані), що, ймовірно, пов'язано із контамінацією вихідної популяції клітин після виділення і очищення. Проте більшість клітин (95,2%) експресували нестин (Рис. 1), що характерно для гіпокампульних клітин-попередників [11].

Слід підкреслити, що прогеніторні клітини в присутності *Matrigel* не генерували нейросфери, а проліферували, утворювали колонії і на 6-у добу культивування розподілялися рівномірно по чашці, формуючи моношар. Така адгезивна культура створює умови для більш рівномірного доступу *FGF-2* до клітин, що сприяє створенню гомогенної популяції недиференційованих прогеніторних клітин.

Таким чином, запропонований протокол дозволяє отримати очищену адгезивну культуру фетальних нейральних прогеніторів з гіпокампа миші.

ЛІТЕРАТУРА

1. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system [Text] / D.K. Ma, M.A. Bonaguidi, G.L. Ming et al. // Cell Res. – 2009. – Vol. 19, № 6. – P. 672–682.
2. Ming G.L. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions [Text] / G.L. Ming, H. Song // Neuron. – 2011. – Vol. 70, № 4. – P. 687–702.
3. Blakemore W.F. Transplantation options for therapeutic central nervous system remyelination [Text] / W.F. Blakemore, R.J. Franklin // Cell Transplant. – 2000. – Vol. 9, № 2. – P. 289–294.
4. Reynolds B.A. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes [Text] / B.A. Reynolds, W. Tetzlaff, S. Weiss // J. Neurosci. – 1992. – Vol. 12. – P. 4565–4574.
5. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain [Text] / V.G. Kukekov, E.D. Laywell, O. Suslov, et al. // Exp. Neurol. – 1999. – Vol. 156, №2. – P. 333–344.
6. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb [Text] / S.F. Pagano, F. Impagnatiello, M. Girelli, et al. // Stem Cells. – 2000. – Vol. 18, № 4. – P. 295–300.
7. Vescovi A.L. Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity *in vitro* and *in vivo* [Text] / A.L. Vescovi, E.Y. Snyder // Brain Pathol. – 1999. – Vol. 9, № 3. – P. 569–598.
8. Palmer T.D. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain [Text] / T.D. Palmer, J. Ray, F.H. Gage // Mol. Cell Neurosci. – 1995. – Vol. 6. – P. 474–486.
9. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential [Text] / B. Jenny, M. Kanemitsu, O. Tsuykov, et al. // Stem Cells – 2009. – Vol. 7. – P. 1309–1317.
10. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus [Text] / H. Babu, J.H. Claasen, S. Kannan, et al. // Front. Neurosci. – 2011. – Vol. 5, article 89.
11. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus [Text] / G. Kempermann, S. Jessberger, B. Steiner, et al. // Trends Neurosci. – 2004. – Vol. 27. – P. 447–452.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автор підтверджує відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 08.09.2014 р.

Прийнята до друку 24.10.2014 р.