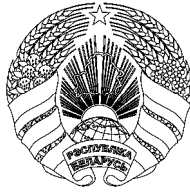


**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 20470

(13) С1

(46) 2016.10.30

(51) МПК

C 12N 5/079 (2010.01)

(54) **СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ТКАНИ СПИННОГО
МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

(21) Номер заявки: а 20121684
(22) 2012.12.03
(23) 2012.06.19
(43) 2014.08.30
(71) Заявитель: Учреждение образования "Полесский государственный университет" (ВУ)
(72) Авторы: Балашевич Татьяна Викторовна; Никандров Виталий Николаевич (ВУ)
(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Полесский государственный университет" (ВУ)

(56) Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. - М.: Наука, 1976. - С. 54-55.
VIII Всероссийская конференция по патологии клетки: Сб. научн. трудов. - М.: МДВ, 2010. - С. 21-23.
Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. - М.: Наука, 1988. - С. 37-48.
FANTETTI K.N. et al. Journal of Visualized Experiments, 2011, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369645/>].
UA 58192 A, 2003.

(57)

Способ культивирования клеток ткани спинного мозга млекопитающего, **отличающийся** тем, что используют синтетическую питательную среду MEM или RPMI-1640, дополнительно содержащую глицин в концентрации 0,01-50,0 мМ.

Изобретение относится к медицине и биологии, в частности к культивированию нервных клеток спинного мозга.

Известен способ культивирования клеток нервной ткани млекопитающих для общебиологических исследований и для практического применения, в частности нейротрансплантации, заключающийся в том, что в синтетическую питательную среду добавляют биологически активную субстанцию, в качестве которой используют сыворотку крови в концентрации 10-45 %, и культивируют в такой среде требуемую органотипическую или диссоциированную культуру [1].

Указанный способ является прототипом по отношению к заявляемому.

Общим признаком заявляемого способа и прототипа является культивирование ткани и клеток спинного мозга млекопитающих путем использования синтетической питательной среды и добавления к ней биологически активной субстанции.

Однако недостатком прототипа является то, что при культивировании спинного мозга в условиях резкого уменьшения содержания сыворотки (0,5 %) жизнеспособность клеток спинного мозга резко снижается. Между тем при культивировании клеток ткани спинного мозга необходимо резкое ограничение содержания сыворотки до 0,5 %, что позволяет обеспечить воспроизводимость результатов опыта вследствие большей стабильности состава среды и снижение влияния дополнительных белков на результаты биологических исследований.

ВУ 20470 С1 2016.10.30

ВУ 20470 С1 2016.10.30

Задачей заявляемого изобретения является увеличение выживаемости клеток ткани спинного мозга млекопитающих в культуре в условиях исключения из состава питательной среды сыворотки крови.

Поставленная задача решается тем, что предложен способ культивирования клеток ткани спинного мозга млекопитающего, заключающийся в том, что используют синтетическую питательную среду MEM или RPMI-1640, дополнительно содержащую глицин в концентрации 0,01-50,0 мМ.

На основании проведенных заявителем исследований установлено, что использование в качестве биологически активной субстанции глицина позволяет значительно увеличить выживаемость клеток культуры нервной ткани спинного мозга.

Пример 1.

Стерильно извлеченные эксплантаты спинного мозга 1-2 сут. новорожденных крысят подвергают механическому и ферментативному (0,025 % раствор трипсина) диспергированию по общепринятой методике [1]. Клеточную суспензию высевают в чашки Петри диаметром 35 мм со специальным покрытием в синтетическую питательную среду RPMI-1640, содержащую 15 % сыворотки крови (эмбриональная телячья + лошадиная сыворотка, 1:1) и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки культивируют в CO₂-инкубаторе при 37 °С со сменой среды каждые 3 сут. Через 14 сут. количество клеток возрастает в 5-9 раз. Количество живых клеток учитывают путем визуального подсчета их в фиксированных зонах монослоя культуры. Затем клетки переносят в питательную среду RPMI-1640, содержащую 0,5 % сыворотки, на семи чашках Петри (пробы № 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7). Через 24 ч к культуре клеток проб № 1-6 добавляют в асептических условиях глицин в концентрации (мМ): проба № 1 - 0,01; проба № 2 - 0,1; проба № 3 - 1,0; проба № 4 - 10,0; проба № 5 - 25,0; проба № 6 - 50,0; а культура клеток пробы № 7 является контролем (глицин не добавляют).

Затем все семь проб инкубируют в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Через 24 и 72 ч проводят прижизненную микроскопию клеток спинного мозга в фазовом контрасте с помощью светового микроскопа ("Opton", Германия) при увеличении объектива 16х, определяют количество клеток, сохраняющих адгезивность (живые), и вычисляют долю живых клеток (выживаемость) в % по сравнению с исходно засеянным количеством. Воздействие глицина при каждой из концентраций проводили трехкратно в 5 параллельных образцах. Результаты испытаний приведены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние добавления глицина на выживаемость клеток (доля живых клеток, %) в первичной культуре спинного мозга в условиях культивирования на дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде RPMI-1640 (приведены средние значения, n = 15)

Тип клеток	Контроль	Концентрация добавленного глицина, мМ					
		0,01	0,1	1,0	10,0	25,0	50,0
Нейрон	20	45	63	85	45	44	40
Астроцит	3	17	38	65	58	43	26
Олигодендроцит	0	5	0	10	27	50	41

Из данных табл. 1 видно, что в условиях дефицита белков сыворотки крови через 3 сут, доля живых клеток (выживаемость) в контроле не превышала 26 %. Сохранение выживаемости всех типов клеток нервной ткани первичной культуры спинного мозга возможно на питательной среде, дефицитной по белкам сыворотки крови, только в присутствии глицина. Выживаемость клеток при добавлении глицина возрастает в 2-6 раз.

Пример 2.

Стерильно извлеченные эксплантаты спинного мозга 1-2 сут. новорожденных крысят подвергают механическому и ферментативному (0,025 % раствор трипсина) диспергиро-

BY 20470 C1 2016.10.30

ванию по общепринятой методике [1]. Клеточную суспензию высевают в чашки Петри диаметром 35 мм со специальным покрытием в синтетическую питательную среду MEM, содержащую 15 % сыворотки крови (эмбриональная телячья + лошадиная сыворотка, 1:1) и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки культивируют в CO₂-инкубаторе при 37 °С со сменой среды каждые 3 сут. Через 14 сут. количество клеток возрастает в 5-9 раз. Количество живых клеток учитывают путем визуального подсчета их в фиксированных зонах монослоя культуры. Затем клетки переносят в питательную среду MEM, содержащую 0,5 % сыворотки, на семи чашках Петри (пробы № 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7). Через 24 ч к культуре клеток проб № 1-6 добавляют в асептических условиях глицин в концентрации (мМ): проба № 1 - 0,01; проба № 2 - 1; проба № 3 - 1,0; проба № 4 - 10,0; проба № 5 - 25,0; проба № 6 - 50,0; а культура клеток пробы № 7 является контролем (глицин не добавляют).

Затем все семь проб инкубируют в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Через 24 и 72 ч проводят прижизненную микроскопию клеток спинного мозга в фазовом контрасте с помощью светового микроскопа ("Opton", Германия) при увеличении объектива 16×, определяют количество клеток, сохраняющих адгезивность (живые), и вычисляют долю живых клеток (выживаемость) в % по сравнению с исходно засеянным количеством. Воздействие глицина при каждой из концентраций проводили трехкратно в 5 параллельных образцах. Результаты испытаний приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Влияние добавления глицина на выживаемость клеток (доля живых клеток, %) в первичной культуре спинного мозга в условиях культивирования на дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде MEM (приведены средние значения, n = 15)

Тип клеток	Контроль	Концентрация добавленного глицина, мМ					
		0,01	0,1	1,0	10,0	25,0	50,0
Нейрон	5	12	13	35	55	55	50
Астроцит	3	8	16	39	60	59	39
Олигодендроцит	0	0	0	4	13	30	39

Из данных табл. 2 видно, что в условиях дефицита белков сыворотки крови через 3 сут. доля живых клеток (выживаемость) в контроле не превышала 26 %. Сохранение выживаемости всех типов клеток нервной ткани первичной культуры спинного мозга возможно на питательной среде, дефицитной по белкам сыворотки крови, только в присутствии глицина. Выживаемость клеток при добавлении глицина возрастает в 2-4 раза.

Таким образом, достигаемый технический результат заявляемого способа заключается в увеличении выживаемости всех типов клеток культивируемой нервной ткани спинного мозга в 2-6 раз в условиях дефицита белков сыворотки крови. Данный способ может найти широкое применение в культивировании клеток нервной ткани спинного мозга и в практической трансплантологии.

Источники информации:

1. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / Под ред. Б.Н.Вепринцева. - М. - 1976. - С. 54-55.