

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **20514**

(13) **С1**

(46) **2016.10.30**

(51) МПК

**C 12N 5/079** (2010.01)

**(54) СПОСОБ АКТИВАЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЮНЫХ НЕЙРОНОВ  
СПИННОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО В КУЛЬТУРЕ  
В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ  
В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

(21) Номер заявки: а 20121678

(22) 2012.12.03

(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) Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды. Тезисы докладов. - Санкт-Петербург, 2010. - С. 24. RU 2247557 С2, 2005. СЕМЕНОВА В.М. и др. Український нейрохірургічний журнал. - 2007. - № 1. - С. 68-72.

(57)

Способ активации дифференцировки юных нейронов спинного мозга млекопитающего в культуре в условиях дефицита белков сыворотки крови в питательной среде, заключающийся в том, что клетки и ткани спинного мозга культивируют в синтетической питательной среде DMEM, а затем добавляют в питательную среду глицин в концентрации 0,75-7,50 мг/мл.

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

Заявителю неизвестен способ активации дифференцировки юных нейронов спинного мозга млекопитающих в культуре в условиях дефицита белков в питательной среде.

Задачей заявляемого изобретения является создание способа активации дифференцировки юных нейронов спинного мозга млекопитающих в культуре в условиях исключения из состава питательной среды сыворотки крови.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ активации дифференцировки юных нейронов спинного мозга млекопитающих в культуре в условиях дефицита белков сыворотки крови в питательной среде, заключающийся в том, что клетки ткани спинного мозга культивируют в синтетической питательной среде DMEM, в которую добавляют глицин в концентрации 0,75-7,50 мг/л.

На основании проведенных заявителем исследований установлено, что использование в качестве активатора дифференцировки юных нейронов глицина позволяет активировать дифференцировку юных нейронов спинного мозга, что выражается в существенном увеличении количества зрелых нейронов, содержащих в цитоплазме субстанцию Ниссля, которой лишены недифференцировавшиеся нейробласты и юные нейроны.

**ВУ 20514 С1 2016.10.30**

## Пример.

Стерильно извлеченные эксплантаты спинного мозга 1-2 сут новорожденных крысят подвергают механическому и ферментативному (0,025 %-ный раствор трипсина) диспергированию по общепринятой методике [1]. Клеточную суспензию высевают в чашки Петри диаметром 35 мм со специальным покрытием в синтетическую питательную среду, содержащую 15 % сыворотки крови (эмбриональная телячья+лошадиная сыворотка, 1:1) и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки культивируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С со сменой среды каждые 3 сут. Через 14 сут. количество клеток возрастает в 5-9 раз, большинство клеток достигает начальных этапов дифференцировки, а культура становится гетерогенной. Затем клетки переносят в питательную среду, содержащую 0,5 % сыворотки, на трех чашках Петри (пробы № 1, № 2 и № 3). Через 24 ч к культуре клеток пробы № 1 добавляют в асептических условиях глицин в концентрации 0,75 мг/мл, к культуре клеток пробы № 2 - глицин в концентрации 7,5 мг/мл, а культура клеток пробы № 3 является контролем (глицин не добавляют).

Затем все три пробы инкубируют в CO<sub>2</sub>-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 дифференцировавшихся нейронов путем окрашивания субстанции Ниссля нейронов витальным красителем (0,025 %-ный метиленовый синий) и после фиксации клеток (0,25 %-ный крезоловый фиолетовый). Воздействие глицина при каждой из концентраций проводили трехкратно в 5 параллельных образцах. Результаты испытаний приведены в таблице.

**Влияние добавления глицина на количество дифференцировавшихся (содержащих субстанцию Ниссля) нейронов (в зоне наблюдения) в первичной культуре спинного мозга в условиях культивирования на дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде (приведены средние значения, n = 15)**

Испытуемый вариант	Время после добавления глицина, ч		
	0	24	72
контроль (без добавления глицина)	100	63	26
+ 0,75 мг/мл глицина	100	107	107
+ 7,50 мг/мл глицина	100	124	138

Из данных таблицы видно, что дифференцировка юных нейронов (не содержащих субстанции Ниссля) в культуре спинного мозга возможна на питательной среде DMEM с дефицитом по белкам сыворотки крови и происходит только при дополнительном внесении в питательную среду глицина. Через 24-72 ч после такого воздействия методом микроскопии регистрировали появление нейронов с короткими отростками, большими ядрами и четкими ядрышками. Данный тип клеток при витальном окрашивании и окрашивании фиксированных препаратов характеризовался наличием в цитоплазме субстанции Ниссля, которая является характерным признаком дифференцировавшихся нейрональных клеток.

В контроле в условиях дефицита белков сыворотки крови содержание в клетках субстанции Ниссля не выявлялось, несмотря на изначальное присутствие в среде DMEM глицина.

Таким образом, достигаемый технический результат заключается в том, что способ позволяет активировать дифференцировку юных нейронов спинного мозга млекопитающих в культуре в условиях дефицита белков сыворотки крови. Данный способ может найти широкое применение в культивировании нейронов спинного мозга и в практической трансплантологии.

# **ВУ 20514 С1 2016.10.30**

Источники информации:

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