



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 5/0619 (2023.05); A61K 31/195 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022132434, 12.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
12.12.2022Дата регистрации:  
23.08.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.12.2022

(45) Опубликовано: 23.08.2023 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ  
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Зеленцова Александра Сергеевна (RU),  
Борисова Алина Юрьевна (RU),  
Шмигера Вероника Сергеевна (RU),  
Дейкин Алексей Васильевич (RU),  
Скоркина Марина Юрьевна (RU),  
Солдатов Владислав Олегович (RU),  
Щро Пламена Румянова (BG)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: CN 0108251372 A, 06.07.2018. YANG  
H. et al. Long-term primary culture of highly-pure  
rat embryonic hippocampal neurons of low-  
density, Neurochem Res, 2010, vol. 35, N. 9, pp.  
1333-1342. ЗЕЛЕНЦОВА А. С. и др. Влияние  
лейтрагина на митохондриальное дыхание  
первичной смешанной культуры нейронов,  
Клеточные технологии в экспериментальной  
медицине : (см. прод.)

(54) Способ культивирования первичной смешанной культуры нейронов для оценки митохондриального дыхания

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярно-клеточной физиологии и биохимии и может быть использовано в клинической фармакологии для тестирования степени воздействия нейротоксинов или нейропротекторов на интенсивность различных звеньев клеточного дыхания. Способ включает получение первичной культуры нейронов гиппокампа у 18-дневного эмбриона либо гиппокампа, среднего мозга или коры мозга мелкого грызуна путем трипсинизации, высевание клеток в предварительно обработанные

культуральные планшеты, инкубирование клеток с использованием высоко- и низкосывороточной нейробазальных культуральных сред, измерение параметров базового митохондриального дыхания на 2, 5, 8 и 11 сутки дифференцировки культуры. При этом высокосывороточная среда содержит 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавку белка В-27, 0,5 мМ L-Glutamax, 1% PenStrep, а низкосывороточная - 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки 2% добавки белка В-27, 1% L-Glutamax, и 1% PenStrep. 2 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции, Курск, 30 сентября 2022 года. - Курск: Курский государственный медицинский университет, сс. 77-80. СКОРКИНА М. Ю. и др. Митохондриальная энергетика первичной смешанной культуры нейронов мышей, Клеточные технологии в экспериментальной медицине: сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции, Курск, 30 сентября 2022 года. - Курск: Курский государственный медицинский университет, сс. 74-76.

R U 2 8 0 2 2 5 4 C 1

R U 2 8 0 2 2 5 4 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/0793* (2010.01)  
*A61K 31/195* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12N 5/0619* (2023.05); *A61K 31/195* (2023.05)

(21)(22) Application: **2022132434, 12.12.2022**

(24) Effective date for property rights:  
**12.12.2022**

Registration date:  
**23.08.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **12.12.2022**

(45) Date of publication: **23.08.2023** Bull. № 24

Mail address:  
**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",  
Toktareva Tatyana Mikhailovna**

(72) Inventor(s):

**Zelentsova Aleksandra Sergeevna (RU),  
Borisova Alina Iurevna (RU),  
Shmigerova Veronika Sergeevna (RU),  
Deikin Aleksei Vasilevich (RU),  
Skorkina Marina Iurevna (RU),  
Soldatov Vladislav Olegovich (RU),  
Shchro Plamena Rumianova (BG)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi  
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF CULTIVATING A PRIMARY MIXED CULTURE OF NEURONS FOR ASSESSING MITOCHONDRIAL RESPIRATION**

(57) Abstract:

FIELD: molecular cell physiology and biochemistry.

SUBSTANCE: invention can be used in clinical pharmacology to test the degree of influence of neurotoxins or neuroprotectors on the intensity of various parts of cellular respiration. The method includes obtaining a primary culture of hippocampal neurons from an 18-day-old embryo or hippocampus, midbrain or cerebral cortex of a small rodent by trypsinization, seeding cells in pre-treated culture plates, incubating cells using high- and low-serum neurobasal culture media, measuring parameters of basic

mitochondrial respiration on days 2, 5, 8 and 11 of culture differentiation. The high-serum medium contains 10% of fetal calf serum, 2% of B-27 protein supplement, 0.5 mM of L-Glutamax, 1% of PenStrep, and low-serum medium contains 0.5% of fetal calf serum, 2% of B-27 protein supplement, 1% of L-Glutamax, and 1% of PenStrep.

EFFECT: obtaining a method of cultivating a primary mixed culture of neurons for assessing mitochondrial respiration.

3 cl, 4 dwg, 1 tbl, 5 ex

Способ культивирования первичной смешанной культуры нейронов относится к области молекулярно-клеточной физиологии и биохимии, и может быть использован в клинической фармакологии для тестирования степени воздействия нейротоксинов или нейропротекторов на интенсивность различных звеньев клеточного дыхания.

5 В области нейробиологии известны различные экспериментальные подходы к выращиванию нейрональных культур. Особое внимание среди них уделено выделению и культивированию нейронов гиппокампа из мозга 18-ти дневных эмбрионов мышей. В частности, распространенным является метод иссечения гиппокампа из мозга 17-18-ти дневного зародыша мыши, помещение ткани в раствор папаина на 10 мин при 37°C, 10 тщательное перемешивание каждые 5 минут, центрифугирование 5 мин при 900 об/мин., ресуспендирование клеточного осадка в культуральной нейробазальной среде, разведение клеточной суспензии 1:10, подсчет клеток на гемоцитометре, высеивание клеток на покровные стекла в 24-луночный планшет при плотности 26 000 клеток/см<sup>2</sup>, 15 выращивание клеток в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C с 5% содержанием CO<sub>2</sub> в течение 7, 14 и 21 дня, с последующей фиксацией 4% параформальдегидом и окрашивание для иммуногистохимического анализа соответствующими красителями [Sahu M.P., Nikkila O., Lågas S., Kolehmainen S., Castre E. Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex // Neuronal Signaling. - 2019. 3: NS20180207.]. Существенным недостатком такого 20 подхода является фиксация клеток параформальдегидом, и отсутствие возможности исследовать митохондриальную функцию нейрональной культуры в режиме реального времени с использованием анализатора клеточного метаболизма Seahorse (Agilent, USA), работа которого основана на датчиках кислорода, использующих фосфоресценцию, что позволяет проводить измерения степени поглощения кислорода и степени закисления 25 среды, оценивая тем самым митохондриальную функцию в монослоях адгезивных клеток, помещенных в многолуночные планшеты [Schmidt C.A., Fieger-Wellman K.H., Neuffer D. From OCR and ECAR to energy: perspectives on design and interpretation of bioenergetics studies // J. of Biological Chemistry. - 2021. 297 (4): 101140]. Существенной 30 технической сложностью при выращивании клеток в многолуночных планшетах Seahorse является малый объем лунки, т. к. площадь поверхности на 40% меньше, чем в 96-ти луночном планшете, краевое нарастание глии и быстрое закисление культуры, отсутствие контроля базового дыхания в ходе дифференцировки первичной смешанной культуры нейронов.

Наиболее близким по своей сущности к заявляемому является способ выращивания 35 первичной культуры нейронов коры головного мозга мелких грызунов на микропланшетах V7 (Seahorse, Bioscience) [Yao J., Irwin R.W., Zhao L., Nilsen J. et al. Mitochondrial bioenergetics deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease // PNAS. 2009 - V. 106(34). - P. 14670-14675].

Для осуществления способа проводят выделение и посев нейронов следующим 40 образом:

1. Получают первичную культуру нейронов коры головного мозга 18-ти дневного эмбриона крысы путем трипсинизации ткани мозга в бикарбонатном буфере Кребса-Рингера, содержащем 0,3% бычьего сывороточного альбумина и 1800 Ед/мл трипсина при 37°C в течение 20 мин.
- 45 2. Высеивают клетки в микропланшеты V7 (Seahorse Bioscience) при плотности посадки 80 000 клеток на лунку площадью 0,32 см<sup>2</sup> в 100 мл нейробазальной среды, содержащей 2% белка B27, 0,5 мМ L-глутамакса, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, пеницилина 100 МЕ/мл и стрептомицина 100 МЕ/мл.

3. Заменяют нейробазальную среду через 2 ч на 0,5 мл культуральной среды, но без эмбриональной сыворотки.

4. Культивируют клетки в инкубаторе при 37°C в кислородо-регулируемом инкубаторе с 92% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub>.

5. Добавляют на 4 день цитозинарабинофуранозид (5мМ) для подавления пролиферации глии.

6. Добавляют на 6 день 0,2 мл свежей нейробазальной среды.

7. Оценивают митохондриальное дыхание путем измерения скорости потребления кислорода однократно на 11-15 день дифференцировки культуры.

10 Недостатком изложенного способа является ограниченное применение - только для первичной культуры нейронов коры головного мозга 18-ти дневного эмбриона мелкого грызуна, длительное инкубирование в бессывороточной среде с целью подавления глиоза и закисления среды. Однократное снятие параметров митохондриального дыхания, в результате чего невозможно проследить изменение митохондриального дыхания клеток в процессе дифференцировки культуры.

15 Задачей предлагаемого изобретения является создание способа культивирования первичной смешанной культуры нейронов, выделенных из различных отделов головного мозга.

20 Технический результат - возможность культивирования первичной смешанной культуры нейронов различных отделов головного мозга, а именно, гиппокампа у 18-ти дневного эмбриона либо нейронов гиппокампа или среднего мозга или коры мозга у новорожденного мелкого грызуна, возможность проследить изменение биоэнергетики клетки, как в норме, так и при воздействии различных фармакологических субстанций (нейропротекторов, нейротоксинов и т.п.) за счет измерения параметров митохондриального дыхания нейронов в культуре *in vitro*. Предлагаемый подход позволяет выявлять раннюю дисфункцию митохондрий на начальных этапах дифференцировки клеток и решать важную научно-практическую задачу, связанную с подбором условий культивирования нейронов в условиях ограниченного пространства, а также тестировать на функционально пригодной культуре нейронов различные фармакологические субстанции, существенно изменяющие митохондриальную активность клетки.

Для достижения указанного технического результата в способе, включающем:

35 - получение первичной культуры нейронов головного мозга мелкого грызуна путем инкубации ткани мозга в трипсине при 37°C в течение 20 мин;

- высеивание клеток в микропланшеты с культуральной нейробазальной средой;

- культивацию клеток в инкубаторе при 37°C;

- добавление свежей порции культуральной нейробазальной среды;

40 - проведение оценки митохондриального дыхания путем измерения скорости потребления кислорода,

внесены следующие новые признаки:

- культивирование первичной смешанной культуры нейронов головного мозга осуществляют с использованием культуральных планшетов Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent);

45 - получают первичную смешанную культуру нейронов различных отделов головного мозга, а именно - гиппокампа у 18-ти дневного эмбриона либо нейронов гиппокампа или среднего мозга или коры мозга у новорожденного мелкого грызуна, что позволяет расширить спектр исследовательских задач, выполняемых на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse;

- культуральные планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent), предварительно обрабатывают poly-D-lysine в концентрации 0,01 мкг/мл и оставляют на час при 37°C в термостате, затем трижды промывают средой Дульбекко, что позволяет нейронам лучше адгезировать к пластику и формировать монослой культуры, и затем  
5 дополнительно обрабатывают культуральной нейробазальной средой, содержащей 2% добавку белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax с выдержкой 10 мин в термостате при 37°C, что позволяет снизить токсичность воздействия poly-D-lysine на нейроны;

- высеивают в культуральные планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent) с высокосывороточной культуральной нейробазальной средой, содержащей 10%  
10 эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавку белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax, на лунку площадью 0,32 см<sup>2</sup> 20000 клеток при выполнении работ с эмбриональной культурой и 40000 клеток при работе с культурой новорожденных грызунов до 5 дневного возраста, что позволяет сохранить оптимальные условия инкубации и получить монослой клеток в планшете, обеспечивает измерение параметров потребления  
15 кислорода и закисления среды и получение объективных данных о функции/дисфункции митохондрий;

- доводят общий объем высокосывороточной культуральной нейробазальной среды до 180 мкл через 30 мин после адгезии клеток от начала процедуры высевания и инкубируют в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C и 5%CO<sub>2</sub>;

20 - через 3 часа проводят замену высокосывороточной культуральной нейробазальной среды на низкосывороточную среду, содержащую 2% добавку белка B-27, 1% L-Glutamax, 0,5% эмбриональную телячью сыворотку и 1% PenStrep;

- продолжают инкубировать в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C 5%CO<sub>2</sub> и при этом  
25 осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом с заменой ½ порции низкосывороточной культуральной нейробазальной среды на свежую каждые 24 часа;

- измеряют параметры базового митохондриального дыхания на 2-е, 5-е, 8-е и 11-е сутки дифференцировки культуры, используя аналитическую среду Agilent;

30 - после каждого измерения митохондриального дыхания заменяют аналитическую среду Agilent на высокосывороточную культуральную нейробазальную среду;

- инкубируют клеточную культуру в высокосывороточной культуральной нейробазальной среде в течение 24 ч, а потом заменяют ее на низкосывороточную нейробазальную среду, и продолжают выращивать культуру на этой среде в CO<sub>2</sub>

35 инкубаторе до следующего измерения;

- строят профиль базального митохондриального дыхания (далее OCR) по значениям, полученным при измерении на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки культивирования, что позволяет на ранних стадиях оценить степень сформированности нейрональной сети в культуре и установить митохондриальную дисфункцию на начальных этапах формирования  
40 культуры, а также выявить функционально неполноценные клетки и не использовать их в работе, экономя тем самым среды и реактивы для культуральных работ.

Предлагаемый способ позволит получить объективные данные об изменении биоэнергетического потенциала и работы митохондрий в культуре на различные сроки дифференцировки. А также оценить степень сформированности нейрональной сети в  
45 культуре по интенсивности митохондриального дыхания. Чередование высокосывороточной среды и низкосывороточной обеспечивает выживаемость нейронов и продолжение дифференцировки клеток после смены аналитической среды. Замена после каждого измерения митохондриального дыхания аналитической среды Agilent

сначала на высокосывороточную среду, позволяет сохранить жизнеспособность клеток в культуре, а дальнейшая ее замена через 24 ч на низкосывороточную среду обеспечивает подавление роста глии при отсутствии антимиотических агентов в среде, и тем самым сохраняется баланс между ростом глии и формированием сети нейронов. Кроме того, измерение базового митохондриального дыхания на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки дифференцировки позволяет установить интенсивность роста культуры.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

Проводят выделение гиппокампа у 18-ти дневного эмбриона либо выделение первичной смешанной культуры нейронов различных отделов головного мозга: гиппокампа или среднего мозга или коры мозга у новорожденного мелкого грызуна. При этом в случае работы с гиппокампом 18 дневного зародыша проводят эктомию матки с эмбрионами и помещают ее в чашку Петри с охлажденным раствором Хенкса, приготовленным в разведении со стерильной дистиллированной водой 1:9. В условиях ламинара отделяют эмбрионы от стенки матки и помещают их в чашку с охлажденным раствором Хенкса. Эмбрионы переносят в сухую чашку Петри под бинокуляр (ув. х 10), отделяют кожу, вскрывают череп, удаляют теменные кости и переносят мозг в чашку Петри с охлажденным фосфатно-буферным раствором, приготовленным в разведении со стерильной дистиллированной водой 1:9. Гиппокамп выделяют под бинокуляром на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Ткань гиппокампа собирают в пробирку, содержащую 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА, и инкубируют 20 минут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе для клеточных культур.

При получении культуры от новорожденных мелких грызунов проводят декаптацию животного, помещают голову на чашку Петри, на льду. Препарирование черепной коробки от кожи и фасций проводят в условиях охлаждения. Извлекают головной мозг и помещают в чашку Петри с охлажденным фосфатно-буферным раствором. Гиппокамп или средний мозг или кору мозга выделяют под бинокуляром (ув. х 10) на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Под стереомикроскопом проводят визуализацию отделов мозга. Отщипывающими движениями отделяют гиппокамп или средний мозг или кору мозга. Ткань собирают в пробирку, содержащую 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА, и инкубируют 20 минут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе для клеточных культур.

Затем раствор трипсина инактивируют фосфатно-буферным раствором до обесцвечивания фенола. Удаляют супернатант, осадок промывают трижды фосфатно-буферным раствором по 1,5 мл. После последней промывки удаляют супернатант, центрифугируют клетки при 1000 об/мин в течение 3 мин. Удаляют супернатант, добавляют к осадку 2 мл нейробазальной культуральной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавку белка B-27, 0,5 mM L-Glutamax, 1% PenStrep.

Для определения объема суспензии необходимого для культивирования первичной смешанной культуры нейронов в планшете Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent) проводят подсчет количества клеток в 1 мл полученной суспензии в камере Горяева, помещая 10 мкл клеточной взвеси в 30 мкл раствора трипанового синего 0,4%. Подсчет живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных в синий цвет) клеток осуществляют в больших квадратах по диагонали, согласно формуле (1):

$$N = \frac{\text{количество клеток}}{\text{количество квадратов}} \times df \times V \times 2,5 \times 10^5, \quad (1)$$

где N - общее количество клеток в 1 мл клеточной суспензии;

количество клеток - сумма количества клеток, выявленных в больших квадратах;  
 количество квадратов - число квадратов, в которых были подсчитаны клетки;  
 df - разведение клеточной взвеси красителем равное 4;  
 V - объем, в котором ресуспендировали осадок - 2 мл;

2,5\*10<sup>5</sup> - коэффициент перерасчета в мл.

Готовят к высеванию клеток культуральные планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent), для чего предварительно обрабатывают их poly-D-lysine в концентрации 0,01 мкг/мл и оставляют на час при 37°C в термостате, трижды промывают средой Дульбекко и затем дополнительно обрабатывают 10 мин в термостате при 37°C нейробазальной средой, содержащей 2% добавки белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax.

Высеивают клетки в высокосывороточную культуральную нейробазальную среду, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавки белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax, 1% PenStrep причем при выполнении работ с эмбриональной культурой высаживают на лунку 20000 клеток, а при работе с культурой новорожденных мелких грызунов не старше 5-ти дневного возраста - 40000 клеток на лунку площадью 0,32 см<sup>2</sup>.

Доводят общий объем среды в ячейке до 180 мкл через 30 мин после адгезии клеток и инкубируют в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 3 часа роста культуры в инкубаторе проводят замену высокосывороточной культуральной нейробазальной среды на низкосывороточную нейробазальную среду, включающую 2% добавки белка B-27, 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки 1% L-Glutamax, и 1% PenStrep.

Осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом и меняют 1/2 порцию низкосывороточной культуральной нейробазальной среды на свежую каждые 24 часа. Измеряют параметры базового митохондриального дыхания на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки дифференцировки культуры, используя аналитическую среду Agilent. Для этого используют среду с низким содержанием буфера, рекомендуемую производителем Seahorse XF DMEM Media, в которую добавляют глюкозу в конечной концентрации 10 мМ, пируват 1 мМ, и L-глутамин 2 мМ, согласно рекомендациям производителя (табл. 1) (<https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/how-to-run-an-assay>).

Таблица 1  
 Приготовление аналитической среды

Реагенты	Финальная концентрация	Объем, мл (10 мл)
Seahorse XF DMEM Medium, pH 7.4 / 103575-100	-	9,7
Seahorse XF Glucose (1.0 M solution) / 103577-100	10 мМ	100 мкл
Seahorse XF Pyruvate (100 mM solution) / 103578-100	1 мМ	100 мкл
Seahorse XF L-Glutamine (200 mM solution) / 103579-100	2 мМ	100 мкл

После каждого измерения заменяют аналитическую среду Agilent на высокосывороточную культуральную нейробазальную среду, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавки белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax, 1% PenStrep. Инкубируют клеточную культуру в высокосывороточной культуральной среде в течение 24 часов, а потом заменяют ее на низкосывороточную среду и продолжают выращивать культуру в CO<sub>2</sub> инкубаторе на этой среде до следующего измерения.

По результатам измерения оценивают функциональную сформированность нейрональной сети в культуре in vitro. Если показатель базального дыхания находится выше границы 50 пмоль/мин, это свидетельствует о физиологической стабильности

культуры и ее последовательном развитии. По результатам OCR строят профиль базального дыхания по суткам инкубации и определяют функционально сформированную нейрональную сеть в культуре при условии выраженного подъема кривой на 5 или 8 сутки инкубации.

5 Графические изображения

Фиг. 1. Схема планшета Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent), включающего 8 лунок, где культуральные лунки - В, С, D, Е, F, G, Н, фоновые лунки без культуры - А, Н.

Фиг.2. Профиль базального дыхания первичной смешанной эмбриональной культуры нейронов гиппокампа мыши линии CD1 на 18-е сутки гестации, где \* -  
10 достоверность данных по сравнению со вторыми сутками дифференцировки.

Фиг. 3. Профиль базального дыхания первичной смешанной культуры нейронов однодневного мышонка линии CD1: среднего мозга; гиппокампа, коры головного мозга, где \* - достоверность данных по сравнению со вторыми сутками дифференцировки.

15 Фиг.4. График «Влияние короткоцепочечного нейропротекторного гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg на митохондриальное дыхание.

Конкретные примеры осуществления способа.

Пример 1. Способ культивирования и оценки митохондриальной функции первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа 18-ти дневного эмбриона мыши линии  
20 CD1.

Для приготовления культуры клеток гиппокампа используют мышь CD1 на 18-ый день беременности. Проводят эктомию матки с эмбрионами и помещают ее в чашку Петри с охлажденным раствором Хенкса, который приготовлен в разведении со стерильной дистиллированной водой 1:9. В условиях ламинара отделяют эмбрионы от  
25 стенки матки и помещают их в чашку с охлажденным раствором Хенкса. Эмбрионов переносят в сухую чашку Петри под бинокляр Leica с увеличением кратным 10, отделяют кожу, вскрывают череп, и переносят мозг в чашку Петри с охлажденным раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, pH=7,4), раствор приготовлен в разведении со стерильной дистиллированной водой 1:9. Гиппокамп выделяют под бинокляром  
30 Leica с увеличением кратным 10, на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Ткань гиппокампа собирают в пробирку, содержащую 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco, 25200056) и инкубируют 20 минут при 37°C, 5%CO<sub>2</sub> в инкубаторе для клеточных культур (Binder, Germany). Инактивируют раствор трипсина фосфатно-буферным раствором до обесцвечивания фенола. Удаляют супернатант, осадок  
35 промывают трижды фосфатно-буферным раствором по 1,5 мл. После последней промывки удаляют супернатант, центрифугируют клетки при 1000 об/мин в течение 3 мин. Удаляют супернатант, добавляют к осадку 2 мл нейробазальной среды (Gibco, 21103049), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Paneco, FB-1001B/50м), 2% добавки белка B-27 (Gibco, 17504044), 0,5 мМ L-Glutamax (Gibco, 25030081), 1%  
40 PenStrep (ПанЭко).

Предварительно готовят планшеты. В канавки вокруг лунок вносят по 400 мкл стерильной дистиллированной воды (фиг. 1). Культуральные лунки В-Г покрывают 10 мкл poly-D-lysine в концентрации 0,01 мг/мл, в лунки коррекции фона А и Н, вносят по 180 мкл дистиллированной воды. Планшеты оставляют на час при 37°C в термостате.  
45 После планшеты трижды промывают средой Дульбекко и покрывают 20 мкл культуральной нейробазальной среды, содержащей 2% добавки белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax на 10 мин с выдержкой в термостате при 37°C, затем среду отбирают, планшеты высушивают.

В соответствии с вышеприведенной формулой (1) определено, что для высевания 20000 клеток в лунку площадью 0,32 см<sup>2</sup> на культуральный планшет Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent) необходимо взять 40 мкл суспензии.

Высеивают в каждую ячейку планшета 40 мкл высокосывороточной нейробазальной культуральной среды, содержащей 20000 клеток. Доводят общий объем среды в ячейке до 180 мкл.

Через 3 часа роста культуры в CO<sub>2</sub> инкубаторе проводят замену высокосывороточной культуральной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавки белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax, 1% PenStrep на низкосывороточную культуральную среду, содержащую 2% добавки белка B-27, 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-Glutamax и 1% PenStrep. Осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом и меняют ½ часть низкосывороточной среды на свежую порцию каждые 24 часа. Измеряют параметры базового митохондриального дыхания на анализаторе клеточного метаболизма Agilent (Seahorse, USA) на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки дифференцировки культуры, используя аналитическую среду Agilent.

В день проведения анализа готовят аналитическую среду Agilent (табл. 1). Планшеты с клетками извлекают из CO<sub>2</sub> инкубатора, удаляют среду для культивации и заменяют ее на приготовленную аналитическую среду Agilent нагретую до 37°C, для чего трижды промывают клетки указанной аналитической средой. После третьей промывки доводят общий объем лунки до 180 мкл аналитической средой Agilent и ставят в инкубатор на 1 ч при 37°C до проведения анализа. Проводят калибровку картриджа и измерение функции базального дыхания.

После измерения функции базального дыхания заменяют аналитическую среду Agilent на высокосывороточную культуральную нейробазальную среду, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавки белка B-27, 0,5 мМ L-Glutamax, 1% PenStrep. Инкубируют клеточную культуру в высокосывороточной среде в течение 24 часов, а потом заменяют ее на низкосывороточную среду, содержащую 2% добавки белка B-27, 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-Glutamax, 1% PenStrep, и продолжают выращивать культуру на этой среде до следующего измерения. Осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом и меняют ½ порцию низкосывороточной культуральной нейробазальной среды на свежую. После каждого измерения на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки рассчитывают параметры базового митохондриального дыхания OCR - скорость потребления кислорода в мин, используя программный продукт Wave (Agilent, USA).

По результатам измерения оценивают функциональную сформированность нейрональной сети в культуре *in vitro*. По результатам скорости потребления кислорода (OCR) строят профиль базального дыхания по суткам инкубации и определяют сформированную нейрональную сеть в культуре на 5 сутки инкубации. Показатель базального дыхания OCR находится выше границы 50 пмоль/мин, что свидетельствует о физиологической стабильности культуры и ее последовательном развитии.

Результаты измерений представлены на Фиг. 2.

Как видно из представленных данных кислородный запрос нервных клеток в культуре *in vitro* существенно возростал на 169% (p<0,05) на 5-е сутки культивирования по сравнению со вторыми сутками. На 8-е сутки культивирования скорость потребления кислорода снижалась в 1,6 раза по сравнению со 2-ми сутками и к 11 суткам превышала значения 2-суток. Выявленная динамика митохондриального дыхания нейронов в культуре согласуется с данными, полученными в лаборатории Мухиной И.В., согласно

которым на 2-е сутки культивирования нейронов гиппокампа наблюдаются начальные стадии формирования отростков, которые имеют на концах колбовидные утолщения с тонкими подвижными пальцевидными выростами. На 3 день развития *in vitro* нейроны образуют кластеры и регистрируется спонтанная активность нейронной сети, на 5-е 5 сутки эти кластеры сливаются в более крупные и на 6-е сутки наблюдается миграция глиальных клеток из кластеров. Согласно данным, представленным в работе [ Cultivation of Primary Hippocampal Cell Cultures for the Functional and Morphological Matching Organization of Single Neurons. O.M. Shirokova, R.A. Sokolov, V.I. Pershin , I.V. Mukhina ; OM&P 2020 Volume 6 Issue 1, pages 27-32 ], на 5-8 день в культуре формируются межнейрональные 10 связи и появляется сетевая пачечная активность, которая зарегистрирована на внеклеточных электродах с короткими межимпульсовыми интервалами. Очевидно, что максимальное митохондриальное дыхание на 5-е сутки связано с формированием межнейрональных связей в культуре.

Пример 2. Способ культивирования и оценки митохондриальной функции первичной 15 смешанной культуры нейронов среднего мозга 1 дневной мыши линии CD1.

Производят получение первичной смешанной культуры среднего мозга от новорожденного 1 дневного мышонка линии CD1 путем препарирования головного мозга и выделения ткани из среднего отдела мозга. Осуществляют декапитацию животного, голову помещают на чашку Петри на льду. Препарирование черепной 20 коробки от кожи и фасций проводят в условиях охлаждения. Извлекают головной мозг и помещают в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,6). Средний отдел мозга выделяют под биноклем Leica (ув. x 10) на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Под стереомикроскопом проводят визуализацию отделов мозга. Отщипывающими движениями отделяют средний мозг 25 от основания и вдоль перехватов от мозжечка и оставшегося переднего отдела. Ткань среднего мозга собирают в пробирку, содержащую 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco, 25200056) и инкубируют 20 минут при 37°C, 5%CO<sub>2</sub> в инкубаторе для клеточных культур (Binder, Germany). Инактивируют раствор трипсина охлажденным фосфатно-буферным раствором до обесцвечивания фенола. Удаляют супернатант, осадок промывают трижды 30 фосфатно-буферным раствором по 1,5 мл. После последней промывки удаляют супернатант, центрифугируют клетки при 1000 об/мин в течение 3 мин. Удаляют супернатант, добавляют к осадку 2 мл культуральной нейробазальной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Paneco, FB-1001B/50м), 2% добавку белка B-27 (Gibco, 17504044), 0,5 мМ L-Glutamax (Gibco, 25030081), 1% PenStrep (ПанЭко). 35 Проводят подсчет клеток в камере Горяева, помещая 10 мкл клеточной взвеси в 30 мкл раствора трипанового синего 0,4% согласно формуле (1). В соответствии с формулой (1) определено, что для высевания 40000 клеток в лунку на культуральный планшет Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent) необходимо 80 мкл суспензии. Для высевания суспензии с клетками культуральные планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent) 40 предварительно готовят как в примере 1. Высаживают клетки, содержащиеся в 80 мкл высокосывороточной культуральной нейробазальной среды, и доводят общий объем среды в ячейке до 180 мкл через 30 мин после адгезии клеток.

Через 3 часа роста культуры в инкубаторе при 37°C, 5%CO<sub>2</sub> проводят замену 45 высокосывороточной среды на низкосывороточную среду, содержащую 2% добавки белка B-27, 1% L-Glutamax, 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% PenStrep. Осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом и меняют ½ часть среды на свежую порцию каждые 24 часа. Измеряют параметры базового митохондриального дыхания на анализаторе клеточного метаболизма Agilent (Seahorse,

USA) на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки дифференцировки культуры, используя аналитическую среду Agilent так же как в примере 1 .

После измерений рассчитывают параметры базового митохондриального дыхания OCR - скорость потребления кислорода в мин, используя программный продукт Wave (Agilent, USA).

По результатам измерения оценивают функциональную сформированность нейрональной сети в культуре *in vitro*. По результатам скорости потребления кислорода (OCR) строят профиль базального дыхания на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки инкубации и определяют функционально сформированную нейрональную сеть в культуре на 5 сутки инкубации. Показатели базального дыхания OCR находятся выше границы 50 пмоль/мин, что свидетельствует о физиологической стабильности культуры и ее последовательном развитии.

Результаты измерений представлены на Фиг. 3.

Как видно из представленных данных на 5-е сутки культивирования существенно возросло потребление кислорода на 192% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со 2-ми сутками. На 8-е сутки дифференцировки культуры скорость потребления кислорода снижалась в 1,6 раза по сравнению со 2-ми сутками и к 11 суткам - потребление кислорода возросло на 42% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, в нейрональной культуре среднего мозга новорожденного мышонка сохраняется картина, характерная для эмбриональной культуры гиппокампа.

Пример 3. Способ культивирования и оценки митохондриальной функции первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа 2-дневной мыши линии CD1.

Для приготовления культуры клеток гиппокампа используют новорожденную мышь 2-х дневного возраста. Осуществляют декапитацию животного, голову помещают на чашку Петри на лёду. Препарирование черепной коробки от кожи и фасций проводят в условиях охлаждения. Извлекают головной мозг и помещают в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,6). Гиппокамп выделяют под бинокуляром Leica с 10-ти кратным увеличением на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Под стереомикроскопом проводят визуализацию отделов мозга, отделяют основание мозга, разворачивают полушария и извлекают гиппокамп на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Ткань гиппокампа собирают в пробирку, содержащую 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco, 25200056) и инкубируют 20 минут при 36,5°C, 5%CO<sub>2</sub> в инкубаторе для клеточных культур (Binder, Germany). Инактивируют раствор трипсина фосфатно-буферным раствором до обесцвечивания фенола. Удаляют супернатант, осадок промывают трижды фосфатно-буферным раствором по 1,5 мл. После последней промывки удаляют супернатант, центрифугируют клетки при 1000 об/мин в течение 3 мин. Удаляют супернатант, добавляют к осадку 2 мл нейробазальной среды (Gibco, 21103049), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Paneco, FB-1001B/50м), 2% добавки белка B-27 (Gibco, 17504044), 0,5 мМ L-Glutamax (Gibco, 25030081), 1% PenStrep (ПанЭко).

Проводят подсчет клеток в камере Горяева, согласно формуле (1). В соответствии с формулой (1) определено, что для высевания 40000 клеток в лунку на культуральный планшет Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent необходимо 80 мкл суспензии. Для высевания суспензии с клетками культуральные планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent) предварительно готовят как в примере 1. Высаживают клетки, содержащиеся в 80 мкл высокосывороточной нейробазальной среды, и доводят общий объем среды в ячейке до 180 мкл через 30 мин после адгезии клеток.

Через 3 часа роста культуры в инкубаторе при 37°C, 5%CO<sub>2</sub> проводят замену

высокосывороточной среды на низкосывороточную среду, содержащую 2% добавки белка B-27, 1% L-Glutamax, 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% PenStrep. Осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом и меняют ½ часть среды на свежую порцию каждые 24 часа. Измеряют параметры базового митохондриального дыхания на анализаторе клеточного метаболизма Agilent (Seahorse, USA) на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки дифференцировки культуры, используя аналитическую среду Agilent, так же как в примере 1

После измерений на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки рассчитывают параметры базового митохондриального дыхания OCR - скорость потребления кислорода в мин, используя программный продукт Wave (Agilent, USA).

По результатам измерения оценивают функциональную сформированность нейрональной сети в культуре *in vitro*. По результатам скорости потребления кислорода (OCR) строят профиль базального дыхания по суткам инкубации и определяют функционально сформированную нейрональную сеть в культуре при условии выраженного подъема кривой на 5 сутки инкубации. Показатели базального дыхания OCR находятся выше границы 50 пмоль/мин, что свидетельствует о физиологической стабильности культуры и ее последовательном развитии.

Результаты измерений представлены на Фиг. 3.

Как видно из представленных данных на 5-е сутки культивирования потребление кислорода увеличилось на 109% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со 2-ми сутками. На 8-е сутки дифференцировки культуры скорость потребления кислорода практически вернулась к исходным цифрам на 2-е сутки дифференцировки и к 11 суткам - потребление кислорода возросло на 88% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, в нейрональной культуре гиппокампа новорожденного мышонка сохраняется картина, характерная для эмбриональной культуры гиппокампа.

Пример 4. Способ культивирования и оценки митохондриальной функции первичной смешанной культуры нейронов коры головного мозга 1-дневной мыши линии CD1.

Для приготовления культуры клеток коры больших полушарий головного мозга используют мышей линии CD1 на 1 сутки после рождения. Проводят декапитацию животного, помещают голову на чашку Петри на льду. Препарирование черепной коробки от кожи и фасций проводят в условиях охлаждения. Извлекают головной мозг и помещают в чашку Петри с охлажденным PBS. Кору больших полушарий головного мозга выделяют под бинокуляром Leica с 10-ти кратным увеличением на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри. Под стереомикроскопом отщипывающими движениями выделяют кору больших полушарий. Ткань коры мозга собирают в пробирку, содержащую 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco, 25200056) и инкубируют 20 минут при 36,5°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе для клеточных культур (Binder, Germany). Инактивируют раствор трипсина раствором PBS до обесцвечивания фенола. Удаляют супернатант, осадок промывают трижды раствором PBS по 1,5 мл. После последней промывки удаляют супернатант, центрифугируют клетки при 1000 об/мин в течение 3 мин. Удаляют супернатант, добавляют к осадку 2 мл высокосывороточной культуральной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Paneco, FB-1001B/50м), 2% добавки белка B-27 (Gibco, 17504044), 0,5 мМ L-Glutamax, (Gibco, 25030081), 1% PenStrep (ПанЭко).

Проводят подсчет клеток в камере Горяева, согласно формуле (1). В соответствии с формулой (1) определено, что для высевания 40000 клеток в лунку на культуральный планшет Cell Culture Miniplate (Seahorse Agilent необходимо 80 мкл суспензии. Для высевания суспензии с клетками культуральные планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse

Agilent) предварительно готовят как в примере 1. Высаживают клетки, содержащиеся в 80 мкл высокосывороточной культуральной нейробазальной среды, и доводят общий объем среды в ячейке до 180 мкл через 30 мин после адгезии клеток.

Через 3 часа роста культуры в инкубаторе при 37°C, 5%CO<sub>2</sub> проводят замену высокосывороточной среды на низкосывороточную среду. Осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом и меняют 1/2 часть среды на свежую порцию каждые 24 часа. Измеряют параметры базового митохондриального дыхания на анализаторе клеточного метаболизма Agilent (Seahorse, USA) на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки дифференцировки культуры, используя аналитическую среду Agilent, как в примере 1.

После измерения заменяют аналитическую среду Agilent на высокосывороточную среду, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавки белка B-27, 0,5 mM L-Glutamax, 1% PenStrep. Инкубируют клеточную культуру в высокосывороточной среде в течение 24 часов, а потом заменяют ее на низкосывороточную среду, и продолжают выращивать культуру на этой среде до следующего измерения. После измерений рассчитывают параметры базового митохондриального дыхания OCR - скорость потребления кислорода в мин, используя программный продукт Wave (Agilent, USA).

По результатам измерения оценивают функциональную сформированность нейрональной сети в культуре *in vitro*. По результатам скорости потребления кислорода (OCR) строят профиль базального дыхания по суткам инкубации и определяют функционально сформированную нейрональную сеть в культуре на 5 сутки инкубации. Показатели базального дыхания OCR находятся выше границы 50 пмоль/мин, что свидетельствует о физиологической стабильности культуры и ее последовательном развитии.

Результаты измерений представлены на Фиг. 3.

Как видно из представленных данных кислородный запрос нервных клеток в культуре *in vitro* на 5-е сутки дифференцировки существенно увеличился на 145% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со вторыми сутками. На 8-е сутки культивирования скорость потребления кислорода недостоверно превышала аналогичные значения 2-х суток дифференцировки. На 11-е сутки дифференцировки потребление кислорода нейронами увеличилось на 115% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со 2-ми сутками. Таким образом, критическим днем в формировании нейрональной культуры с максимальным кислородным запросом следует считать 5-е сутки дифференцировки.

Пример 5. Изучение влияния нейропротектора на митохондриальное дыхание первичной смешанной культуры нейронов среднего мозга однодневной мыши линии CD1.

Культуру нейронов среднего отдела головного мозга однодневной мыши линии CD1 готовят в соответствии с примером 2. Влияние короткоцепочечного нейропротекторного гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg на параметры тканевого дыхания оценивали на 7 сутки дифференцировки культуры. В эксперименте использовали препарат в концентрации 100 нМ и 1 мкМ, которые вводили в объеме 20 мкл в клеточную культуру через порт А сенсорного картриджа. В лунки В, G вводили препарат в дозе 100 нМ, в лунки С, F - вводили препарат в дозе 1000 нМ, лунки D, E - контрольные, без препарата. В порт В каждой лунки добавляли 22 мкл олигомицина, в порт С - 25 мкл FCCP, в порт D - 27 мкл ротенон/антимицин А.

Установлено развитие митохондриальной дисфункции под влиянием нейропротекторного гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg в культуре нейронов здоровой новорожденной мыши. Доказано, что лейтрагин в дозе 100 нМ снижает

максимальную дыхательную способность нейронов на 54% ( $p < 0,05$ ) и продукцию АТФ на 53,4% ( $p < 0,05$ ), при этом усиливает немитохондриальное дыхание на 41,4% ( $p < 0,05$ ) и гликолитическую способность клеток по сравнению с контролем (фиг.4).

5 Все эксперименты выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинская декларация этических принципов, 2008) и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

10 Приведенные примеры подтверждают достижение технического результата предлагаемого способа культивирования первичной смешанной культуры нейронов для оценки митохондриального дыхания. Способ технически прост, позволяет осуществлять манипуляции с культурами нейронов полученных как от эмбрионов, так и новорожденных мелких грызунов, на ранних стадиях позволяет выявлять функционально не полноценные клетки и не использовать их в работе, экономя тем самым среды и реактивы для культуральных работ, а также выращивать клетки в 15 условиях ограниченного пространства, сохраняя баланс между ростом глиии и формированием сети нейронов, что обеспечивает получение объективных данных профиля базального митохондриального дыхания по значениям OCR на 2-е, 5-е, 8-е, 11-е сутки культивирования и оценку степени сформированности нейрональной сети в культуре. Предлагаемый способ может быть использован в молекулярно-клеточной 20 физиологии, биохимии и клинической фармакологии для тестирования степени воздействия нейротоксинов или нейропротекторов на интенсивность различных звеньев клеточного дыхания.

#### (57) Формула изобретения

25 1. Способ культивирования первичной смешанной культуры нейронов, включающий получение первичной культуры нейронов головного мозга мелкого грызуна путем трипсинизации ткани мозга при 37°C в течение 20 мин, высевание клеток в микропланшеты с культуральной нейробазальной средой, культивацию клеток в инкубаторе при 37°C, добавление свежей порции нейробазальной среды, проведение 30 оценки митохондриального дыхания путем измерения скорости потребления кислорода, отличающийся тем, что получают первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа у 18-дневного эмбриона либо гиппокампа или среднего мозга или коры мозга мелкого грызуна, после трипсинизации инактивируют раствор трипсина фосфатно-буферным раствором до обесцвечивания фенола, удаляют супернатант, осадок трижды 35 промывают фосфатно-буферным раствором по 1,5 мл, после чего центрифугируют клетки при 1000 об/мин в течение 3 мин и добавляют к осадку 2 мл высокосывороточной культуральной нейробазальной среды, затем культуральные планшеты Cell Culture Miniplate готовят к посеву культуры нейронов, для чего предварительно их обрабатывают poly-D-lysine в концентрации 0,01 мкг/мл и оставляют на час при 37°C 40 в термостате, трижды промывают средой Дульбекко, а затем дополнительно обрабатывают нейробазальной средой, содержащей 2% добавки белка В-27, 0,5 мМ L-Glutamaх с выдержкой 10 мин в термостате при 37°C, после чего высеивают в культуральные планшеты Cell Culture Miniplate с высокосывороточной культуральной нейробазальной средой на лунку площадью 0,32 см<sup>2</sup> 20000 клеток при выполнении 45 работ с эмбриональной культурой и 40000 клеток при работе с культурой новорожденных грызунов до 5-дневного возраста, через 30 мин доводят общий объем высокосывороточной культуральной нейробазальной среды до 180 мкл, инкубируют в СО<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C и 5%СО<sub>2</sub>, через 3 часа проводят замену высокосывороточной

культуральной нейробазальной среды на низкосывороточную культуральную нейробазальную среду и продолжают инкубировать при тех же условиях, при этом осуществляют ежедневный контроль роста культуры под микроскопом с заменой порции низкосывороточной культуральной нейробазальной среды на свежую каждые 5 24 часа, измеряют параметры базового митохондриального дыхания на 2-е, 5-е, 8-е и 11-е сутки дифференцировки культуры на анализаторе клеточного метаболизма Agilent, для чего в день проведения анализа готовят аналитическую среду Agilent, планшеты с клетками извлекают из CO<sub>2</sub> инкубатора, удаляют среду для культивации и заменяют ее на приготовленную аналитическую среду нагретую до 37°C, трижды промывая 10 клетки указанной аналитической средой, после третьей промывки доводят общий объем лунки до 180 мкл аналитической средой Agilent и ставят в инкубатор на 1 ч при 37°C до проведения анализа, при этом после каждого измерения заменяют аналитическую среду Agilent на высокосывороточную культуральную нейробазальную среду и продолжают инкубирование в течение 24 часов, после чего заменяют 15 высокосывороточную культуральную нейробазальную среду на низкосывороточную культуральную нейробазальную среду и продолжают выращивать культуру на этой среде в CO<sub>2</sub> инкубаторе до следующего измерения, по параметрам базового митохондриального дыхания на 2-е, 5-е, 8-е и 11-е сутки дифференцировки культуры строят профиль базального дыхания.

20 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что высокосывороточная нейробазальная культуральная среда содержит 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавку белка В-27, 0,5 мМ L-Glutamax, 1% PenStrep.

25 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что низкосывороточная культуральная нейробазальная среда содержит 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% добавку белка В-27, 1% L-Glutamax и 1% PenStrep.

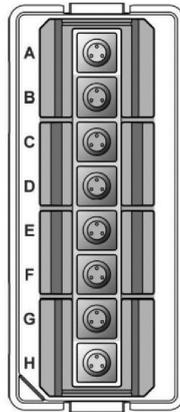
30

35

40

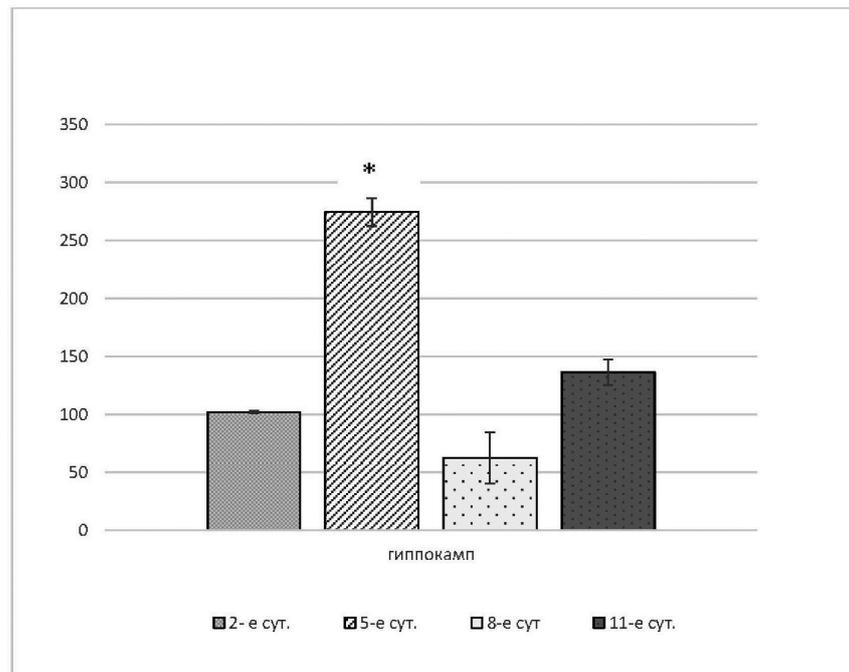
45

1



Фиг. 1

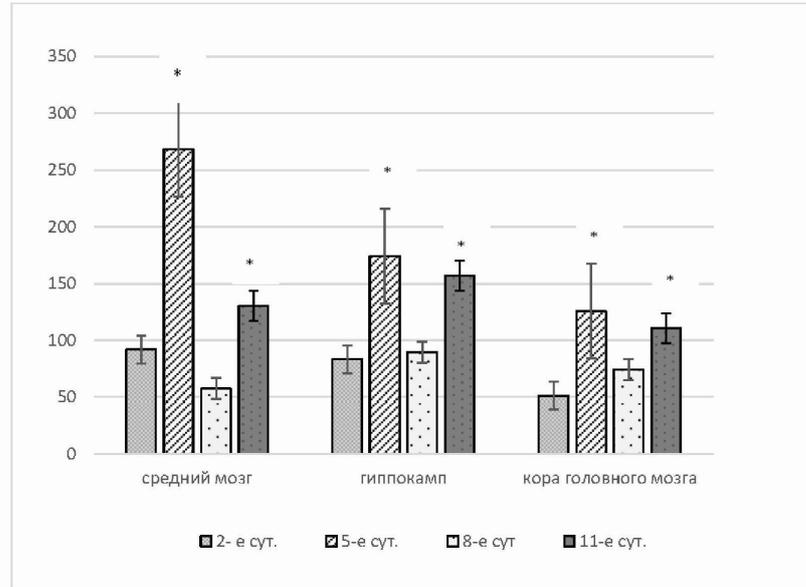
Скорость потребления кислорода (OCR)  
пМоль/мин



Фиг.2

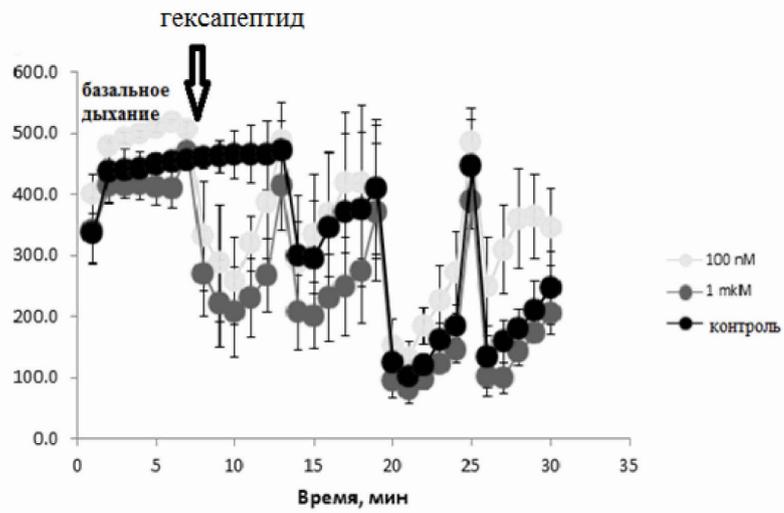
2

Скорость потребления кислорода (OCR)  
пМоль/мин



Фиг.3

Скорость потребления кислорода (OCR)  
пМоль/мин



Фиг.4