



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14519 (13) A

(51) C 12 N 5/00

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ

1

(21) 93007567

(22) 28.12.93

(24) 09.01.97

(46) 25.04.97. Бюл. № 2

(47) 09.01.97

(72) Дворцевой Володимир Костянтинович, Воловельська Єлизавета Леонідівна, Коптьолов Віталій Олександрович, Дворцевой Володимир Володимирович

(73) Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України (UA)

(57) Спосіб получения ізолированих гепатоцитів, включающий перфузію печені сахарозной середой, содержащей ЭДТА, с последующей дезагрегацией ткани и выделе-

2

нием целевого продукта, отличающийся тем, что перфузию проводят в течение 5-6 мин, причем в перфузионную среду дополнительно вводят 0,25%-ный раствор трипсина, ЭДТА берут в концентрации 1,0-1,2 мМ при следующем соотношении компонентов:

Сахароза	70-100 г/л
Хлористый калий	0,010-0,022 г/л
Хлористый натрий	0,009-0,030 г/л
ЭДТА	0,5-0,8 г/л
Трипсин	0,5-1,0 мл
Вода бидистиллированная	до 1 л.

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в клеточной биологии и экспериментальной медицине.

Известен способ получения изолированных гепатоцитов, включающий двухэтапную перфузию органа раствором Локка, содержащим 3 мМ ЭДТА, и дезагрегацию в сахарозной среде [1].

Недостатками способа являются трудоемкость, длительность и низкий выход жизнеспособных клеток.

Наиболее близким к заявляемому по своей сущности и достигаемому эффекту является способ получения изолированных гепатоцитов [2], включающий перфузию печені в течение 15-20 мин сахарозным раствором, содержащим ЭДТА в концентрации

3,5-4,5 мМ, при следующем соотношении компонентов, г/л (рН 7,4):

Сахароза	70-100
Хлористый калий	0,300-0,400
Хлористый магний	0,100-0,200
Фосфорнокислый калий	0,030-0,080
Фосфорнокислый натрий	0,050-0,100
ЭДТА	1,300-1,675
Трис-НСІ-буфер	до 1 л.

После перфузии печені подвергают дезагрегации с помощью вибрационного устройства и отделяют жизнеспособные гепатоциты.

Недостатком способа является низкий уровень структурно-функциональной сохранности изолированных гепатоцитов.

(19) UA (11) 14519 (13) A

Задачей изобретения является создание такого способа получения изолированных гепатоцитов, в котором путем изменения состава перфузионной среды и времени перфузии можно было бы снизить повреждающее действие этих двух факторов и тем самым повысить структурно-функциональную сохранность гепатоцитов

Эта задача решается тем, что в способе получения изолированных гепатоцитов, включающем перфузию печени сахарозной средой, содержащей ЭДТА, с последующей дезагрегацией ткани и выделением целевого продукта, перфузию проводят в течение 5-6 мин, в перфузионную среду дополнительно вводят 0,25%-ный раствор трипсина, а ЭДТА берут в концентрации 1,0-1,2 мМ при следующем соотношении компонентов (рН 8,0):

Сахароза	70-100 г/л
Хлористый калий	0,010-0,022 г/л
Хлористый натрий	0,009-0,030 г/л
ЭДТА	0,5-0,8 г/л
Трипсин	0,5-1,0 мл

Вода бидистиллированная до 1 л.

Способ получения изолированных гепатоцитов иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Анестезированным животным весом 150-300 гр вскрывали брюшную полость, вводили инъекционную иглу в воротную вену и закрепляли лигатурой. Нижнюю полую вену надсекали для оттока перфузата. Перфузию проводили через систему переливания крови с использованием перистальтического насоса сахарозным раствором следующего состава (рН 8,0):

Сахароза	86,0 г/л
KCl	0,011 г/л
NaCl	0,0095 г/л
ЭДТА	0,6 г/л
Трипсин	1 мл

Вода бидистиллированная до 1 л.

Трипсин использовали 25%-ный, выпускаемый в фасовке по 500 мл Томским НИИ вакцин и сывороток.

Нагретый до 37°C раствор пропускали через орган в течение 6 мин (объем перфуза-

та 100 мл). После окончания перфузии печень извлекали из брюшной полости, измельчали ножницами и подвергали дезагрегации с помощью вибрационного устройства. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр.

Отделение жизнеспособных гепатоцитов от поврежденных проводили путем центрифугирования первичной суспензии гепатоцитов в течение 3 мин при 1000 об/мин. После отделения клетки промывали средой 199, содержащей 5%-ную сыворотку эмбриона человека. Уровень структурно-функциональной сохранности, предполагающий более тонкую корреляцию и координацию процессов со стороны различных систем клетки, оценивали по прикреплению клеток в культуре [3] и по включению в клетку флуоресцеиндиацетата [4].

В табл. 1 представлены результаты исследования гепатоцитов, выделенных предлагаемым и известным способами.

Из табл. 1 видно, что предлагаемый способ позволяет получить гепатоциты с более высоким уровнем структурно-функциональной сохранности, чем прототип.

Пример 2. Способ осуществляли аналогично примеру 1, но с различными концентрациями ЭДТА в перфузионном растворе. Результаты приведены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что оптимальная концентрация ЭДТА в перфузионной среде 1,0-1,2 мМ. При концентрациях выше или ниже заявляемых снижается выход жизнеспособных клеток.

Пример 3. Способ осуществляли аналогично примеру 1, но в среду перфузии не вводили трипсин.

Результаты представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, отсутствие трипсина в перфузионной среде приводит к резкому снижению показателей структурно-функциональной сохранности гепатоцитов.

Пример 4. Способ осуществляли аналогично примеру 1, но перфузию проводили средами, одна из которых содержала минимально допустимые, а другая - максимально допустимые количества компонентов (рН 8,0):

Компоненты	min	max
Сахароза	70,0 г/л	1000,0 г/л
Хлористый калий	0,010 г/л	0,022 г/л
Хлористый натрий	0,009 г/л	0,030 г/л
ЭДТА	0,5 г/л	0,8 г/л
Трипсин	0,5 г/л	1,0 г/л
Вода бидистиллированная	до 1 л.	

Результаты приведены в табл. 4

Из табл. 4 следует, что перфузия печени средами, содержащими минимальные и максимальные количества компонентов, обеспечивает возможность получения клеток с высоким уровнем структурно-функциональной сохранности.

Пример 5. Способ осуществляли аналогично примеру 1, но изменяли время $n=9-12$

перфузии печени.

Результаты представлены в таблице 5.

Из табл. 5 видно, что оптимальное время перфузии 5-6 мин.

Таким образом, из проведенных экспериментов следует, что предлагаемый способ позволяет повысить структурно-функциональную сохранность изолированных гепатоцитов в 1,5-2 раза.

Таблица 1

Показатели	По изобретению	Известный
Вес животного, гр	150-300	150-300
Количество клеток на вес печени, млн	501 ± 90	553 ± 60
Исключение трипанового синего, %	93 ± 8	90 ± 5
Прикрепление клеток в культуре после 2-х ч инкубации при 37°C, %	98 ± 2	60 ± 9
Количество клеток, накапливающих флуоресцеин, %	72 ± 3	40 ± 2

Таблица 2

$n=8$

Показатели	Концентрация ЭДТА, Мм			
	0,5	1,0	1,2	1,5
Количество клеток на вес печени, млн. кл.	380 ± 25	490 ± 40	600 ± 60	460 ± 10
Исключение трипанового синего, %	86 ± 3	90 ± 2	92 ± 4	88 ± 7
Прикрепление клеток в культуре после 2-х ч инкубации при 37°C, %	70 ± 9	92 ± 6	98 ± 3	89 ± 6
Количество клеток, накапливающих флуоресцеин, %	60 ± 8	70 ± 7	80 ± 6	70 ± 7

Таблица 3

$n=6-8$

Показатели	Без трипсина	С трипсином
Количество клеток на вес печени, млн. кл.	295 ± 20	501 ± 90
Исключение трипанового синего, %	28 ± 6	93 ± 8
Прикрепление клеток в культуре после 2-х ч инкубации при 37°C, %	12 ± 2	98 ± 2
Количество клеток, накапливающих флуоресцеин, %	7 ± 3	40 ± 2

Таблиця 4

n=6

Показатели	Соотношение компонентов	
	min	max
Количество клеток на вес печени, млн. кл.	500 ± 35	510 ± 40
Исключение трипанового синего, %	90 ± 2	93 ± 8
Прикрепление клеток в культуре после 2-х ч инкубации при 37°C, %	87 ± 6	98 ± 2
Количество клеток, накапливающих флуоресцеин, %	60 ± 8	78 ± 6

Таблиця 5

n=8

Показатели	Время перфузии, мин			
	2	5	6	10
Количество клеток на вес печени, млн. кл.	400 ± 20	501 ± 24	501 ± 90	440 ± 70
Исключение трипанового синего, %	82 ± 3	93 ± 2	93 ± 8	86 ± 5
Прикрепление клеток в культуре после 2-х ч инкубации при 37°C, %	79 ± 8	98 ± 6	98 ± 2	60 ± 9
Количество клеток, накапливающих флуоресцеин, %	86 ± 5	72 ± 4	72 ± 3	48 ± 2

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Куль

Замовлення 4135

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101