



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
C12N 5/07 (2010.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008132219/13, 04.08.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
04.08.2008

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2010

(45) Опубликовано: 10.06.2010 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 9415459, 21.07.1994. BERRY M.N.: «High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells», 1969, J. Cell Biol., Vol 43, p.506-520. PEREA M.Sc. A.: «Stadies on the effect of syntetic amino acid mixtures on bile secretion in the isolated perfused rat liver», 1987, Vol 7, Issue 1, p.89-99.

Адрес для переписки:  
644099, г.Омск, наб. Тухачевского, 14,  
научно-исследовательский сектор

(72) Автор(ы):

Антонова Елена Ивановна (RU),  
Мкртчян Офелия Завеновна (RU),  
Плешакова Валентина Ивановна (RU),  
Высокогорский Валерий Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное  
учреждение высшего профессионального  
образования "Омский государственный  
педагогический университет" (ГОУ ОмГПУ)  
(RU)

## (54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ С ПОЙКИЛОТЕРМНОЙ СИСТЕМОЙ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ (АМФИБИИ, ЧЕРЕПАХИ)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к выделению гепатоцитов животных с пойкилотермной системой терморегуляции, и может быть использовано при диагностике вирусных инфекций и производстве вакцин. Выделяют гепатоциты с использованием при вторичном перфузировании трех-четырёхкратной обработки печени раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в концентрации от 0,02 до 0,05% по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C. Очистку гепатоцитов в фиколловом градиенте проводят трех-четырёхкратно с

добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, 15 мин на центрифуге при 1000 об/мин при температуре 20°C. Получение клеточной суспензии гепатоцитов путем дифференциального центрифугирования проводят в течение 2 минут при 700 об/минуту. Исходную клеточную суспензию гепатоцитов предварительно инкубируют при комнатной температуре в течение 20 минут. Изобретение позволяет повысить выход жизнеспособных гепатоцитов животных с пойкилотермной системой терморегуляции на 20% по сравнению с традиционной методикой выделения клеток. 4 табл.

RU 2 391 398 C2

RU 2 391 398 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

<p>(21), (22) Application: <b>2008132219/13, 04.08.2008</b></p> <p>(24) Effective date for property rights: <b>04.08.2008</b></p> <p>(43) Application published: <b>10.02.2010</b></p> <p>(45) Date of publication: <b>10.06.2010 Bull. 16</b></p> <p>Mail address: <b>644099, g.Omsk, nab. Tukhachevskogo, 14, nauchno-issledovatel'skij sektor</b></p>	<p>(72) Inventor(s): <b>Antonova Elena Ivanovna (RU), Mkrtchan Ofelija Zavenovna (RU), Pleshakova Valentina Ivanovna (RU), Vysokogorskij Valerij Evgen'evich (RU)</b></p> <p>(73) Proprietor(s): <b>Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovanija "Omskij gosudarstvennyj pedagogicheskij universitet" (GOU OmGPU) (RU)</b></p>
--	--

**(54) METHOD OF EXTRACTING HEPATOCYTES OF POIKILOTHERMIC ANIMALS (AMPHIBIANS, TORTOISES)**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, specifically to extraction of hepatocytes of poikilothermic animals and can be used in diagnosis of viral infections and making vaccines. Hepatocytes are extracted through secondary perfusion three-fourfold treatment of the liver using Hanks solution which contains calcium ions and collagenase type I in concentration of 0.02-0.05% for 10 minutes at perfusate temperature of 0-4°C. Hepatocytes are purified in a ficoll gradient three-four times with

addition of 0.5-1.15 M carbohydrates, e.g. sucrose, 15 minutes on a centrifuge at 1000 rpm at temperature 20°C. A hepatocyte cell-rich fluid is obtained through differential centrifugation for 2 minutes at 700 rpm. The initial hepatocyte cell-rich suspension is pre-incubated at room temperature for 20 minutes.

EFFECT: invention increases output of living hepatocytes of poikilothermic animals by 20% compared to the traditional cell extraction technique.

4 tbl, 4 ex

RU 2 391 398 C2

RU 2 391 398 C2

Изобретение относится к биологии и медицине и может быть использовано для изучения механизмов функционирования клеток, управления клеточными процессами, такими как пролиферация и дифференцировка, для изучения основ межклеточных взаимодействий и модификации метаболизма в условиях физиологической нормы и эксперименте, при диагностике вирусных инфекций с целью изучения спектра чувствительности культур гепатоцитов различных животных к вирусам, в биотехнологических процессах при производстве вакцин, замещении, восстановлении, корректировке функций поврежденных тканей печени путем имплантации или трансплантации выращенных *in vitro* гепатоцитов.

Известен способ выделения гепатоцитов животных с пойкилотермной системой терморегуляции (амфибий, черепах), который подробно описан в книге Адамса Р., М.: Мир, 1983, и этот же способ хорошо представлен в коллективной монографии «Животная клетка в культуре». М.: Спутник+, 2000.

Известный способ включает в себя: вскрытие брюшной полости и канюлирование *v. portae*, через которую осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, вторичное перфузирование печени раствором Хэнкса, содержащим раствор коллагеназы и ионы кальция в течение 5 минут при температуре 37°C, механическую обработку печени путем измельчения печени ножницами на кусочки весом 1-2 гр, которые переносят в колбу, содержащую среду Игла, помещаемую на магнитную мешалку на 5 минут. После обработки на магнитной мешалке проводят очистку полученной тканевой взвеси в фиколювом градиенте 15 мин на центрифуге при 1000 об/мин при температуре 20°C с целью удаления клеточного детрита, элементов крови, гемопоэтических клеток, крупных фрагментов, после чего полученный осадок ресуспендируют в инкубационной среде. Далее с целью удаления дебриса поврежденных клеток клеточную суспензию пропускают через фильтр в колбу и оставляют для предварительной инкубации на 20 минут при температуре 37°C на шейкере. Для получения популяции паренхимных клеток проводят фильтрацию и дифференциальное центрифугирование в течение 5 мин при 200 об/минуту. После чего в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл. Далее культивирование гепатоцитов проводят в чашках Петри, на дно которых помещают покровные стекла, предварительно обработанные, например, желатином.

Однако известный способ не может обеспечить получение жизнеспособных гепатоцитов более 75% у изучаемых видов животных с различной системой терморегуляции, так как длительный период выделения гепатоцитов (6-8 часов) влечет за собой потерю жизнеспособных клеток, и, кроме того, в известном способе не предусмотрены условия, позволяющие поддерживать жизнеспособность гепатоцитов.

Следует особо подчеркнуть, что высокий процент жизнеспособных гепатоцитов является необходимым условием для успешного проведения медико-биологических исследований, а следовательно, получения значимых (достоверных) исследуемых показателей.

Задачей предлагаемого изобретения является повышение процента выхода жизнеспособных гепатоцитов животных вида *Rana terrestris* (амфибии), *Trachemys scripta elegans* (черепахи) с пойкилотермной системой терморегуляции.

Поставленная задача - увеличение процента выхода жизнеспособных гепатоцитов животных вида *Rana terrestris* (амфибии), *Trachemys scripta elegans* (черепахи), решается благодаря тому, что заявляемый способ выделения, как и прототип, включает в себя

5 вскрытие брюшной полости, канюлирование *v. portae*, через которую осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, вторичное перфузирование печени проводят раствором Хэнкса, содержащим раствор коллагеназы I типа и ионы кальция, измельчение печени  
10 на кусочки весом 1-2 гр, которые переносят в колбу, содержащую среду Игла, которую затем помещают на магнитную мешалку на 5 минут, после чего проводят очистку полученной тканевой взвеси в фиколовом градиенте на центрифуге с целью удаления клеточного детрита, элементов крови, гемопоэтических клеток, крупных  
15 фрагментов, затем полученный осадок ресуспензируют в инкубационной среде, далее клеточную суспензию фильтруют в колбу и оставляют для предварительной инкубации на шейкере с целью удаления дебриса поврежденных клеток. Для получения популяции паренхимных клеток проводят фильтрацию и  
20 дифференциальное центрифугирование. После чего в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл. Далее культивирование гепатоцитов проводят в чашках Петри, на дно которых помещают покровные стекла, предварительно  
25 обработанные, например, желатином.

30 В отличие от прототипа в заявляемом способе вторичное перфузирование печени животных вида *Rana terrestris* (амфибии), *Trachemys scripta elegans* (черепахи) проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим коллагеназу I типа и ионы кальция в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C, а очистку гепатоцитов проводят в фиколовом градиенте трех-  
35 четырехкратно с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, 15 мин на центрифуге при 1000 об/мин при температуре 20°C, при этом получение клеточной суспензии гепатоцитов проводили путем сочетания фильтрации и дифференциального центрифугирования в течение 2 мин при 700 об/минуту, затем исходную клеточную  
40 суспензию гепатоцитов пропускают через фильтр в колбу и оставляют на шейкере для предварительной инкубации на 20 минут при 20-22°C, учитывая систему терморегуляции животных.

Заявляемый способ «Способ выделения гепатоцитов животных с пойкилотермной системой терморегуляции (амфибии, черепахи)» реализуется следующим образом.

35 Под эфирным наркозом у животного (амфибии и черепахи) проводят вскрытие брюшной полости канюлирование *v. portae*, через которую осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, затем трех-четырекратно проводят вторичное  
40 перфузирование печени раствором Хэнкса, содержащим коллагеназу I типа и ионы кальция в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C. Затем после удаления Глиссоновой капсулы и крупных кровеносных сосудов печень измельчали в пенициллиновом флаконе ножницами на кусочки  
45 весом 1-2 г, которые переносят в колбу, содержащую среду Игла, которую затем помещают на магнитную мешалку, например, типа MS3000, Biosan, Латвия, на 5 минут. После чего проводят трех-четырекратную очистку полученной тканевой взвеси в фиколовом градиенте по 15 мин на центрифуге, например, ОПН-3, Киргизия,  
50 при 1000 об/мин при температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, с целью удаления клеточного детрита, элементов крови, гемопоэтических клеток, крупных фрагментов. Затем полученный осадок ресуспензируют в инкубационной среде, далее полученную клеточную суспензию фильтруют через нейлоновые фильтры в колбу и оставляют для предварительной инкубации на 20

минут при температуре 20-22°C на шейкере, например, типа BS-010108-AK, UP-12, Biosan, Латвия, с целью удаления дебриса поврежденных клеток. Для получения популяции паренхимных клеток проводят фильтрацию через нейлоновые фильтры и дифференциальное центрифугирование, например, типа VAC-601 в течение 2 мин при 700 об/минуту. После чего в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл. Далее клеточную суспензию разливают в чашки Петри, на дно которых помещают покровные стекла, предварительно обработанные 0,2% раствором желатина (Sigma, США). Инкубировали гепатоциты в среде F12, которая содержала 0,2 мг/мл альбумина (Sigma, США) и 0,5 мкг/мл инсулина (Sigma, США), а также содержащей 40 мкг/мл гентамицина, 10% фетальной сыворотки (РАА, Австрия), 25 ед./мл фактора LIF (Sigma, США). Далее чашки Петри помещают в термостат, например, типа BS-010410-BAА, CH-100, Biosan, Латвия, для культивирования при температуре 20°C.

Пример 1. Влияние дробной перфузии и температурных режимов на процент выхода жизнеспособных гепатоцитов амфибий и черепах.

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование v. portae, через которую осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция. Вторичное перфузирование печени проводят согласно сформированным группам дробно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%). Для опыта сформировали три группы амфибий и черепах:

1 группа - перфузия проводилась однократно 5 минут раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа от 0,02 до 0,05% при комнатной температуре;

2 группа - 10 минут раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа от 0,02 до 0,05% трехкратно при температуре 10-15°C;

3 - группа 10 минут трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа от 0,02 до 0,05% при температуре 0-4°C.

Из таблицы 1 видно, самый высокий процент выхода жизнеспособных гепатоцитов (98%) в третьей группе, в которой перфузию печени проводили трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C. Так как мягкое, постепенное, менее глубокое ферментативное воздействие на мембраны гепатоцитов положительно сказывается на их жизнеспособности.

Таблица 1		
Влияние дробной перфузии и температурных режимов на процент выхода гепатоцитов амфибий и черепах (% жизнеспособных клеток)		
№ группы	Амфибии	Черепахи
1 группа	80	78
2 группа	89	86
3 группа	98	98

Затем печень измельчали ножницами, как этап механической обработки, тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку, после чего проводили трех-четырекратную очистку тканевой взвеси в фиколювом градиенте 15 мин на центрифуге 1000 об/мин при температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, после этого получали клеточную суспензию гепатоцитов путем сочетания фильтрации и

дифференциального центрифугирования 2 мин при 700 об/минуту, последующую предварительную инкубацию гепатоцитов проводят на шейкере при 20-22°C 20 минут. Полученную клеточную суспензию гепатоцитов в количестве 3 мл ( $3 \times 10^6$  гепатоцитов) разливают в чашки Петри, на дне которых находятся покровные стекла покрытые желатином. После чего в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл. Далее чашки Петри помещают в термостат для культивирования при температуре 20°C.

Пример 2. Получение клеточной суспензии амфибий и черепах и очистка в фиколловоом градиенте с добавлением углеводов.

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование v. portae, через которую осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция. Вторичное перфузирование печени проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C. Далее проводили механическую обработку печени путем измельчения, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку.

Проводили очистку тканевой взвеси в фиколловоом градиенте. Для опыта сформировали три группы амфибий, черепах:

- 1 группа - очистка в фиколловоом градиенте однократная;
- 2 группа - очистка в фиколловоом градиенте трех-четырекратно;
- 3-группа - очистка в фиколловоом градиенте трех-четырекратно с добавлением 0,5-1,15 М углеводов.

Влияние дробной очистки в фиколловоом градиенте с добавлением углеводов на процент выхода гепатоцитов (% жизнеспособных клеток)		
№ группы	Амфибии	Черепахи
1 группа	76	78
2 группа	80	84
3 группа	96	96

Из таблицы 2 видно, что добавление углеводов и трех-четырекратно очистка в фиколловоом градиенте повышают выход жизнеспособных гепатоцитов в 3 группе на 18-20% по сравнению с первой группой и на 12-16% по сравнению со второй. Предлагаемая углеводная метаболическая коррекция способствует сохранности и стабилизации мембран и энергетического обмена митохондрий, обеспечивая сохранность жизнеспособных гепатоцитов.

В дальнейшем получали клеточную суспензию гепатоцитов путем сочетания фильтрации и дифференциального центрифугирования 2 мин при 700 об/минуту, предварительную инкубацию гепатоцитов проводили на шейкере при 20-22°C 20 минут, после чего разливали в чашки Петри в количестве 3 мл ( $3 \times 10^6$  гепатоцитов), на дне которых находятся покровные стекла, покрытые желатином. После чего в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл. Далее чашки Петри помещают в термостат для культивирования при температуре 20°C.

Пример 3. Получение паренхимной клеточной суспензии амфибий и черепах.

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование v.

portaе, через которую осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция. Вторичное перфузирование печени проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C. Далее проводили механическую обработку печени путем измельчения, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку. Трех-четырекратная очистка тканевой взвеси в фиколлово

механическую обработку печени путем измельчения, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку. Трех-четырекратная очистка тканевой взвеси в фиколлово

Для дальнейшего получения паренхимной клеточной суспензии экспериментально подбирали режимы дифференциального центрифугирования:

I - 5 минут при 200 об/мин;

II - 5 минут при 700 об/мин;

III - 2 минуты при 700 об/мин.

Влияние различных режимов дифференциального центрифугирования на процент выхода гепатоцитов (% жизнеспособных клеток)		
№ группы	Амфибии	Черепahi
1 группа	74	75
2 группа	79	80
3 группа	96	96

Из таблицы 3 видно, что самый высокий выход жизнеспособных гепатоцитов наблюдался при 3 режиме (2 минуты при 700 об/мин) - 96%, который является оптимальным, т.к. этим режимом достигается минимальное механическое воздействие на гепатоциты и дифференцированное разделение паренхимных и непаренхимных клеток печени.

Полученную таким образом суспензию гепатоцитов предварительно инкубируют на шейкере при 20-22°C 20 минут, затем в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл, разливают по 3 мл ( $3 \times 10^6$  гепатоцитов) в чашки Петри, на дне которых находятся покровные стекла, покрытые желатином. Далее чашки Петри помещают в термостат для культивирования при температуре 20°C.

Пример 4. Подбор оптимальных температурных режимов для предварительного инкубирования гепатоцитов амфибий и черепах.

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование v. portaе, через которую сначала осуществляют перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, затем проводят трех-четырекратно вторичное перфузирование печени раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 10 минут при температуре перфузата 0-4°C. Затем печень измельчали ножницами, как этап механической обработки, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку с дальнейшей трех-четырекратной очисткой в фиколлово

механическую обработку печени путем измельчения, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку с дальнейшей трех-четырекратной очисткой в фиколлово

добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы. В дальнейшем получали клеточную суспензию гепатоцитов путем сочетания фильтрации и дифференциального центрифугирования 2 мин при 700 об/минуту. Для отработки режима предварительной инкубации на шейкере подбирали оптимальный температурный режим:

- 37-38°C;

- 20-22°C;

- 5-10°C.

Оптимальным температурным режимом для поддержания жизнеспособности гепатоцитов является комнатная температура - 20-22°C, при которой активность ферментов обеспечивает стабильное жизнеспособное состояние гепатоцитов. При температуре же в 37-38°C моделируется эффект гипертермии, а температура 5-10°C не обеспечивает стабильного жизнеспособного состояния гепатоцитов.

После предварительной инкубации полученную клеточную суспензию в количестве 3 мл ( $3 \times 10^6$  гепатоцитов) разливают в чашки Петри, на дне которых находятся покровные стекла, покрытые желатином. Затем в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в  $3 \times 10^6$  кл/мл, для инкубации разливают по 3 мл ( $3 \times 10^6$  гепатоцитов) в чашки Петри, на дне которых находятся покровные стекла, покрытые желатином. Далее чашки Петри помещают в термостат для культивирования при температуре 20°C.

Из таблицы 4 видно, что изменение условий выделения гепатоцитов амфибий и черепах в предлагаемом способе увеличивает на 20% выход жизнеспособных гепатоцитов на этапе посева для культивирования в чашках Петри по сравнению с прототипом.

Таблица 4		
Сравнительные показатели процента выделенных гепатоцитов для культивирования (% жизнеспособных клеток)		
Вид животных	Общее количество гепатоцитов 1 мл/10 <sup>6</sup> (прототип)	Общее количество гепатоцитов 1 мл/10 <sup>6</sup> (предлагаемый способ)
Rana terrestris	76	96
Trachemys scripta elegans	76	96

### Формула изобретения

Способ выделения гепатоцитов животных вида *Rana terrestris* (амфибии) и *Trachemys scripta elegans* (черепахи), включающий в себя вскрытие брюшной полости, канюлирование, двухэтапное перфузирование, механическую обработку печени, очистку гепатоцитов, фильтрацию и дифференциальное центрифугирование, предварительную инкубацию и высевание гепатоцитов в чашки Петри с определением количества жизнеспособных гепатоцитов в камере Горяева, отличающийся тем, что вторичное перфузирование печени проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим коллагеназу I типа в концентрации 0,02-0,05% по 10 мин при температуре перфузата 0-4°C, а очистку гепатоцитов осуществляют трех-четырекратно в фиколловом градиенте с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, фильтрацию и дифференциальное центрифугирование проводят при 700 об/мин с экспозицией в 2 мин, предварительную инкубацию гепатоцитов проводят при 20-22°C в течение 20 мин.