



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009146401/10, 14.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.12.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.12.2009

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2011 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 10.11.2011 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: АДАМС Р. Методы культуры клеток для биохимиков. - М.: Мир, 1983, с.70-72. WO 9415459 A1, 21.07.1994. BERRY MN et al., High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study, J Cell Biol., 1969, v.43, №3, p.506-520.

Адрес для переписки:

644099, г.Омск, наб. Тухачевского, 14, ГОУ "Омский государственный педагогический университет", 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 ПТИЦ ВИДА *Columba livia*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биологии и медицины и касается способа выделения гепатоцитов птиц вида *Columba livia*. Представленный способ включает вскрытие брюшной полости, канюлирование v.portae, через которую осуществляют двухэтапное перфузирование, механическую обработку печени, очистку гепатоцитов, фильтрацию и дифференциальное центрифугирование, предварительную инкубацию и высевание гепатоцитов в камере Горяева, при этом первичное перфузирование печени проводят бескальциевым раствором Хэнкса, а вторичное перфузирование печени проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I

типа в концентрации 0,02-0,05% по 20 мин при температуре перфузата 15-16°C, очистку гепатоцитов в фиколовом градиенте проводят трех-четырекратно по 15 мин на центрифуге при 1000 об/мин при температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М сахарозы, дифференциальное центрифугирование проводят при 700 об/мин с экспозицией в 2 мин, а предварительную инкубацию гепатоцитов проводят при 37°C в течение 20 мин. Представленное изобретение позволяет повысить процент выхода жизнеспособных гепатоцитов птиц вида *Columba livia*, а также может быть использовано для изучения механизмов функционирования клеток, при диагностике вирусных инфекций, при производстве вакцин, корректировке функций

RU 2 4 3 3 1 7 6 C 2

RU 2 4 3 3 1 7 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 5/07 (2010.01)
A61K 35/407 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009146401/10, 14.12.2009**

(24) Effective date for property rights:
14.12.2009

Priority:

(22) Date of filing: **14.12.2009**

(43) Application published: **20.06.2011 Bull. 17**

(45) Date of publication: **10.11.2011 Bull. 31**

Mail address:

**644099, g.Omsk, nab. Tukhachevskogo, 14, GOU
"Omskij gosudarstvennyj pedagogicheskij
universitet", nauchno-issledovatel'skij sektor**

(72) Inventor(s):

**Antonova Elena Ivanovna (RU),
Mkrtchan Ofelija Zavenovna (RU),
Pleshakova Valentina Ivanovna (RU),
Vysokogorskij Valerij Evgen'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovanija "Omskij
gosudarstvennyj pedagogicheskij universitet"
(GOU OmGPU) (RU)**

(54) METHOD OF ISOLATING HEPATOCYTES FROM BIRDS OF GENUS *Columba livia*

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method includes opening of abdominal cavity, cannulating of v.portae, through which two-step perfusing is performed, mechanical processing of liver, purification of hepatocytes, filtration and differential centrifuging, preliminary incubation and inoculation of hepatocytes in Goryaev chamber, primary perfusing being performed with calcium-free Hanks solution, the secondary one being performed three-four times with Hanks solution, which contains calcium ions and 1 type collagenase in concentration 0.02-0.05% for 20 minutes at perfusate temperature 15-16°C; purification of

hepatocytes in ficoll gradient is performed three-four times for 15 minutes on centrifuge with 1000 rev/min at temperature 20°C with addition of 0.5-1.15 M of saccharose, differential centrifuging is carried out with 700 rev/min with 2 minute exposition; preliminary incubation of hepatocytes is carried out at 37°C for 20 minutes.

EFFECT: invention makes it possible to increase percentage of output of viable hepatocytes of birds of genus *Columba livia*, and can be used for studying mechanisms of cell functioning, in diagnostics of viral infections, in production of vaccines, correction of functions of injured liver tissues.

3 tbl, 3 ex

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 в 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.

К настоящему времени нам не известны способы выделения гепатоцитов птиц вида *Columba livia*, имеющие признаки, общие с заявляемым способом.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка способа, который обеспечил бы выделение гепатоцитов птиц вида *Columba livia* с высоким процентом выхода жизнеспособных 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.

Поставленная задача решается благодаря тому, что заявляемый способ включает в себя такие признаки, как: вскрытие брюшной полости, канюлирование *v. portae*, через которую осуществляют 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, при этом первичное перфузирование печени проводят бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, а вторичное перфузирование печени проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в концентрации 0,02-0,05% по 20 мин при температуре перфузата 15-16°C, трех-четырекратную очистку гепатоцитов в фиколовом градиенте по 15 мин на центрифуге при 1000 об/мин и температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М углеводов - сахарозы, дифференциальное центрифугирование осуществляют при 700 об/мин с экспозицией в 2 мин, а предварительную инкубацию гепатоцитов проводят при 37°C в течение 20 мин.

Заявляемый способ выделения гепатоцитов птиц вида *Columba livia* реализуется следующим образом.

Под эфирным наркозом у птицы проводят вскрытие брюшной полости, канюлирование *v. portae*, через которую осуществляют первичное перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, затем трех-четырекратно проводят вторичное перфузирование печени раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 20 мин при температуре перфузата 15-16°C. Затем после удаления Глиссоновой капсулы и крупных кровеносных сосудов печень измельчают в пенициллиновом флаконе ножницами на кусочки 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), при 1000 об/мин и температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, с целью удаления клеточного детрита, элементов крови, гемопоэтических клеток и крупных

фрагментов. Затем полученный осадок ресуспензируют в инкубационной среде, а далее полученную клеточную суспензию фильтруют через нейлоновые фильтры в колбу и оставляют для предварительной инкубации на 20 мин при температуре 37°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/мин. После чего в камере Горяева 1% раствором трипанового синего определяют количество жизнеспособных гепатоцитов при концентрации клеток в 3×10^6 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-ВАА, СП-100, Biosan (Латвия), для культивирования при температуре 37°C.

Приводим конкретные примеры реализации заявляемого способа.

Пример 1. Влияние дробной перфузии и температурных режимов на процент выхода жизнеспособных гепатоцитов птиц *Columba livia*

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование v. portae, через которую осуществляют первичное 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 птиц:

1 группа - перфузию проводили однократно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и 0,05% коллагеназу I типа, 5 мин при комнатной температуре;

2 группа - 10 мин трехкратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации при температуре перфузата 10-15°C;

3 - группа 20 мин трехкратно раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации при температуре перфузата 15-16°C.

Таблица 1	
Влияние дробной перфузии и температурных режимов на процент выхода гепатоцитов (% жизнеспособных клеток)	
№ группы	Птицы вида <i>Columba livia</i>
1 группа	86
2 группа	89
3 группа	98

Таблица 1 подтверждает, что для птиц, печень которых отличается высокой плотностью, дробное перфузирование коллагеназой трехкратно по 20 мин при температуре перфузата 15-16°C (3 группа) является оптимальным и обеспечивает максимальный процент выхода жизнеспособных гепатоцитов в сравнении с первой и второй группой.

Затем печень измельчали ножницами, как этап механической обработки, тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку, после чего проводили трех-четырёхкратную

очистку тканевой взвеси в фиколловоm градиенте 15 мин на центрифуге 1000 об/мин при температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы, получали клеточную суспензию гепатоцитов путем сочетания фильтрации и дифференциального центрифугирования 2 мин при 700 об/мин, последующую предварительную инкубацию гепатоцитов проводят на шейкере в термостате при температуре 37°C 20 мин. Полученную клеточную суспензию гепатоцитов в количестве 3 мл (3×10^6 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 3×10^6 кл/мл. Далее чашки Петри помещают в термостат, для культивирования при температуре 37°C.

Пример 2. Получение клеточной суспензии и очистка в фиколловоm градиенте с добавлением углеводов у птиц *Columba livia*

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование *v. portae*, через которую осуществляют первичное перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция. Вторичное перфузирование проводят раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 20 мин при температуре перфузата 15-16°C. Далее печень измельчали ножницами, как этап механической обработки, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку.

Проводили очистку тканевой взвеси в фиколловоm градиенте. Для опыта сформировали три группы птиц:

1 группа - очистка в фиколловоm градиенте однократная;

2 группа - очистка в фиколловоm градиенте трех-четыреxкратная;

3 группа - очистка в фиколловоm градиенте трех-четыреxкратная с добавлением 0,5-1,15 М углеводов.

Из таблицы 2 видно, что добавление углеводов и трех-четыреxкратная очистка в фиколловоm градиенте повышает выход жизнеспособных гепатоцитов в 3 группе на 19% по сравнению с первой группой и на 11% - по сравнению со второй.

Предлагаемая углеводная метаболическая коррекция способствует сохранности и стабилизации мембран и энергетического обмена митохондрий, обеспечивая сохранность жизнеспособных гепатоцитов.

Влияние дробной очистки в фиколловоm градиенте с добавлением углеводов на процент выхода гепатоцитов (% жизнеспособных клеток)	
№ группы	Птицы вида <i>Columba livia</i>
1 группа	78
2 группа	86
3 группа	97

Далее получали клеточную суспензию гепатоцитов путем сочетания фильтрации и дифференциального центрифугирования 2 мин при 700 об/мин, последующую предварительную инкубацию гепатоцитов на шейкере проводят 20 мин в термостате при температуре 37°C. Полученную клеточную суспензию гепатоцитов в количестве 3 мл (3×10^6 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 3×10^6 кл/мл. Далее чашки Петри помещают в термостат для культивирования при температуре 37°C .

Пример 3. Получение паренхимной клеточной суспензии птиц *Columba livia*

Животному вскрывали брюшную полость, затем проводили канюлирование v. portae, через которую осуществляют первичное перфузирование печени бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция. Вторичное перфузирование проводят раствором Хэнкса, содержащим ионы кальция и коллагеназу I типа в восходящей концентрации (от 0,02 до 0,05%) по 20 мин при температуре перфузата $15-16^\circ\text{C}$. Далее печень измельчали ножницами, как этап механической обработки, полученную тканевую взвесь помещали на магнитную мешалку. Проводили очистку тканевой взвеси в фиколлово-градiente трех-четырёхкратно по 15 мин на центрифуге 1000 об/мин при температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М углеводов, например сахарозы.

Для получения паренхимной клеточной суспензии экспериментально подбирали режимы дифференциального центрифугирования:

I режим - 5 мин при 200 об/мин;

II режим - 5 мин при 700 об/мин;

III режим - 2 мин при 700 об/мин.

Из таблицы 3 видно, что самый высокий выход жизнеспособных гепатоцитов наблюдался при 3 режиме (2 мин при 700 об/мин) - 97%, которые является оптимальным, так как этим режимом достигается минимальное механическое воздействие на гепатоциты и дифференцированное разделение паренхимных и непаренхимных клеток печени.

Таблица 3	
Влияние различных режимов дифференциального центрифугирования на процент выхода гепатоцитов (% жизнеспособных клеток)	
№ группы	Птицы вида <i>Columba livia</i>
1 группа	74
2 группа	83
3 группа	97

Последующую предварительную инкубацию гепатоцитов на шейкере проводят 20 мин в термостате при температуре 37°C . Полученную клеточную суспензию гепатоцитов в количестве 3 мл (3×10^6 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 3×10^6 кл/мл. Далее чашки Петри помещают в термостат для культивирования при температуре 37°C .

Полученные культуры представляет собой морфологически однородную популяцию клеток, сохраняющую стабильный кариотип, свободную от посторонних агентов. Монослойная культура имеет вид морфологически однородного слоя клеток, прикрепленных к стеклу и покрытых прозрачной питательной средой красно-оранжевого цвета. Работу с препаратом проводят в стерильных условиях. До вскрытия бутылок с клетками обращают внимание на их целостность и концентрацию ионов в среде (рН) не ниже 7,0.

Таким образом, заявляемый способ обеспечивает выделение гепатоцитов птиц вида *Columba livia* с высоким (до 97) процентом выхода жизнеспособных гепатоцитов.

Формула изобретения

Способ выделения гепатоцитов птиц вида *Columba livia*, включающий в себя вскрытие брюшной полости, канюлирование v. portae, через которую осуществляют двухэтапное перфузирование, механическую обработку печени, очистку гепатоцитов, фильтрацию и дифференциальное центрифугирование, предварительную инкубацию и
5 высеивание гепатоцитов в чашки Петри с определением количества жизнеспособных гепатоцитов в камере Горяева, при этом первичное перфузирование печени проводят бескальциевым раствором Хэнкса для отмывки крови и удаления ионов кальция, а вторичное перфузирование печени проводят трех-четырекратно раствором Хэнкса,
10 содержащим ионы кальция и коллагеназу 1 типа в концентрации 0,02-0,05% по 20 мин при температуре перфузата 15-16°C, трех-четырекратную очистку гепатоцитов в фиколловом градиенте по 15 мин на центрифуге 1000 об/мин при температуре 20°C с добавлением 0,5-1,15 М сахарозы, дифференциальное центрифугирование
15 осуществляют при 700 об/мин с экспозицией в 2 мин, а предварительную инкубацию гепатоцитов проводят при 37°C в течение 20 мин.

20

25

30

35

40

45

50