



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37910 (13) A

(51) 7 C12N5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ

(21) 2000052521

(22) 04.05.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Бондаренко Валерій Антонович, Коптьолов Віталій Олександрович, Кудокоцева Олена Валентинівна, Лжанін Сергій Миколайович, Середа Тетяна Петрівна

(73) Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України

(57) Спосіб одержання ізольованих гепатоцитів, який включає перфузію печінки сахарозним розчином, що містить 1мМ ЕДТА і трипсин, з наступною дезагрегацією й відокремленням цільового продукту, який відрізняється тим, що перфузію здійснюють із швидкістю 45-50 мл/хв. і у два етапи, причому на першому етапі використовують сахарозний розчин, який містить тільки ЕДТА, а на другому - ЕДТА і 0,02-0,03% трипсину.

Винахід належить до біології та медицини і може використовуватись в клітинній терапії.

Відомий спосіб одержання ізольованих гепатоцитів, який включає перфузію печінки сахарозним розчином, який містить 1 мМ ЕДТА, дезагрегацію та відокремлення життєздатних клітин [1].

Недоліком способу є низький рівень структурно-функціонального збереження ізольованих гепатоцитів.

Найближчим до способу за винаходом за своєю суттю й досягнутим ефектом є спосіб одержання ізольованих гепатоцитів, який включає перфузію печінки зі швидкістю 15-22 мл/хв сахарозним середовищем, що містить 1,0-1,2 мМ ЕДТА і 0,00025% трипсину, наступну дезагрегацію й відокремлення життєздатних клітин [2].

Проте цей спосіб не забезпечує високого структурно-функціонального збереження ізольованих гепатоцитів, свідченням чого є факт, що близько 30% одержаних клітин втрачають здатність накопичувати флуоресцеїн.

Задачею винаходу є створення такого способу одержання ізольованих гепатоцитів, у якому шляхом змін умов перфузії забезпечувалася б можливість підвищення структурно-функціонального збереження клітин.

Ця задача вирішується тим, що в способі одержання ізольованих гепатоцитів, який включає перфузію печінки сахарозним розчином, який містить 1 мМ ЕДТА і трипсин, з наступною дезагрегацією й відокремленням цільового продукту, перфузію проводять зі швидкістю 45-50 мл/хв в два етапи: на першому етапі використовують сахарозний розчин, який містить лише ЕДТА, а на другому - ЕДТА і 0,02-0,03% трипсину.

Проведення перфузії з більш високою швидкістю і в два етапи дозволяє збільшити кількість клітин, здатних накопичувати флуоресцеїн, в 1,5 раза.

Спосіб одержання ізольованих гепатоцитів ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Анестезованим тваринам вагою 150-300 г розтинали черевну порожнину, вводили ін'єкційну голку в воротну вену і закріплювали лігатурою.

Нижню порожнисту вену надсікали для стоку перфузата. На першому етапі перфузію проводили за допомогою системи переливання крові з використанням перистальтичного насоса сахарозним розчином такого складу:

сахароза	43 г/л
NaCl	4,5 г/л
KCl	0,45 г/л
NaHCO <sub>3</sub>	0,25 г/л
ЕДТА	0,3 г/л
вода бідистильована	до 1 л
pH	7,4

Нагрітий до 37°C розчин пропускали через печінку протягом 5 хв зі швидкістю 45-50 мл/хв. Після цього виймали печінку з черевної порожнини і затискували затискачем верхню порожнисту вену, потім підвішували над склянкою з розчином і знову перфузували рециркуляторно зі швидкістю 45-50 мл/хв сахарозним розчином, що містить додатково трипсин фірми "Ferak":

сахароза	43 г/л
NaCl	4,5 г/л
KCl	0,45 г/л
NaHCO <sub>3</sub>	0,25 г/л
ЕДТА	0,3 г/л

трипсин	0,25 г/л
вода бідистильована	до 1 л
pH	8,0

Після перфузії печінку продавлювали крізь нейлон на холоді в сахарозно-сольовому середовищі такого складу:

сахароза	86 г/л
KCl	0,4 г/л
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 г/л
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,04 г/л
CaCl <sub>2</sub>	0,14 г/л
HEPES	2,4 г/л
альбумін	10 г/л
вода бідистильована	до 1 л
pH	7,4

Після фільтрації відокремлювали життєздатні гепатоцити від пошкоджених шляхом центрифугування протягом 3 хв. при 1000 об/хв і наступного триразового центрифугування протягом 1 хв. Після відділення клітини промивали сахарозно-сольовим середовищем. Структурно-функціональне збереження клітин оцінювали за прикріпленням клітин у культурі [3], за прокрашуванням трипановим синім і накопиченням клітинами флуоресцеїну [4].

В табл. 1 надані результати дослідження гепатоцитів, одержаних запропонованим і відомим способами.

З табл. 1 видно, що спосіб, який пропонується, дозволяє одержати гепатоцити з більш високим рівнем структурно-функціонального збереження, про що свідчить збільшення кількості клітин, здатних накопичувати флуоресцеїн.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що перфузію проводили з різними швидкостями. Результати представлені в табл. 2.

Як видно з табл. 2, зменшення або збільшення швидкості перфузії призводить до різкого зниження показників структурно-функціонального збереження гепатоцитів.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що змінювали умови проведення перфузії: 1) в один етап сахарозним розчином, що містить 0,3 г/л ЕДТА; 2) в один етап розчином, що містить 0,3 г/л ЕДТА і 0,25 г/л трипсину; 3) в два етапи розчином, що містить 0,3 г/л ЕДТА; 4) в два етапи розчином, що містить 0,3 г/л ЕДТА і 0,25 г/л трипсину; 5) відповідно до винаходу в два етапи: на першому розчином, який містить 0,3 г/л ЕДТА, на другому - 0,3 г/л ЕДТА і 0,25 г/л трипсину. Результати представлені в табл. 3.

З табл. 3 видно, що проведення перфузії в 1 етап або 2 етапи, але одним і тим же розчином призводить до зниження структурно-функціонального збереження клітин.

Приклад 4. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1 за винятком того, що в розчині, який використовується на другому етапі перфузії, змінювали вміст трипсину.

Результати представлені в табл. 4.

З табл. 4 видно, що оптимальна концентрація трипсину у перфузійному розчині 0,02-0,03%. При концентрації нижче заявленої знижується вихід і структурно-функціональне збереження клітин, а при більш високій - втрачається здатність клітин прикріплюватися до колагенової підкладки.

Джерела інформації

1. СССР, А.с. № 1310426, С12N5/00, 1987.
2. Україна, Пат. № 14519, С12N5/00, 1987.
3. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фреони. - М.: Мир, 1989. - С. 76.
4. СССР, А.с. № 1067442, G01N33/48, 1984.

Таблиця 1

Структурно-функціональне збереження гепатоцитів n=9

Показники	Спосіб одержання	
	відомий	за винаходом
Кількість клітин печінки, млн.	501±90	498±95
Прокрашування трипановим синім, %	93±8	95±4
Прикріплення клітин у культурі після 2 годин інкубації при 37°C, %	98±2	97±3
Кількість клітин, що накопичують флуоресцеїн, %	72±3	98±2

Таблиця 2

Структурно-функціональне збереження гепатоцитів залежно від швидкості перфузії n=8

Показники	Швидкість перфузії, мл/хв		
	15-20	45-50	80-90
Кількість клітин, млн.	443±50	516±30	301±25
Прокрашування трипановим синім, %	65±10	95±3	11±8
Прикріплення клітин у культурі після 2 годин інкубації при 37°, %	57±6	98±2	5±2
Кількість клітин, що накопичують флуоресцеїн, %	49±6	97±2	3±1

Таблиця 3

Структурно-функціональне збереження гепатоцитів залежно від умов перфузії п=5-7

Показники	Умови перфузії				
	1	2	3	4	5
Кількість клітин печінки, млн.	411±80	503±30	407±67	539±55	498±95
Прикрашування трипановим синім, %	38±9	81±5	43±19	78±11	95±4
Прикріплення клітин у культурі після 2 годин інкубації при 37°C, %	31±8	11±3	37±11	9±8	97±3
Кількість клітин, що накопичують флуоресцеїн, %	30±9	56±12	35±11	43±21	98±2

Таблиця 4

Структурно-функціональне збереження гепатоцитів залежно від концентрації трипсину в перфузійному розчині п=7

Показники	Концентрація трипсину, %		
	0,01	0,02-0,03	0,05
Кількість клітин печінки, млн.	299±50	511±30	507±25
Прокрашування трипановим синім, %	45±10	95±3	85±8
Прикріплення клітин у культурі після 2 годин інкубації при 37°C, %	39±6	98±2	0
Кількість клітин, що накопичують флуоресцеїн, %	34±6	97±2	83±11

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2001 р. Формат 60х84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
(044) 268-25-22