

Е. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш,
С. В. Подольская, А. Д. Швед, А. И. Смикодуб

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Описан простой метод выделения эмбриональных гепатоцитов человека, позволяющий получить до 90 % жизнеспособных клеток. Печень обрабатывали ферментативно-механическим способом и культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 12—14 дней.

Введение. В настоящее время культивирование клеток и тканей животных используется в различных областях исследований — от клеточной и молекулярной биологии до быстро прогрессирующих прикладных областей биотехнологии. При этом для многих целей предпочтительнее применять клетки человека неопухолевого происхождения. Источником таких клеток может служить абортный материал. Эмбриональные ткани обладают многими практическими преимуществами. Как правило, культуры, выделенные из эмбриональных тканей, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих взрослых тканей [1]. Кроме того, не все органы человека доступны для биопсии. Поэтому печень эмбриона человека, на наш взгляд, наиболее пригодна для получения гепатоцитов.

Существующие методы выделения и культивирования гепатоцитов [2, 3, 5, 6] отличаются сложностью, значительным повреждением клеток в процессе приготовления культуры, использованием дорогостоящих реактивов и компонентов для сред. Некоторые манипуляции, например перфузия, вообще неприемлемы при работе с материалом печени эмбрионов человека.

Часто в связи с масштабами и задачами исследования нужен более простой способ выделения и культивирования клеток. Такой вариант методики и был нами разработан.

Материалы и методы. В основу разработки был положен ферментативно-механический метод обработки исходной ткани со сведением к минимуму манипуляций, повреждающих эмбриональные гепатоциты. Источником культур служила печень 8—12-недельных эмбрионов человека. Материал получали при операциях прерывания беременности методом вакуумэкстракции [4].

Извлеченный эмбрион стерильно переносили в стеклянную бутылку с 10 мл раствора Хэнкса, содержащего антибиотик канамицин в концентрации 500 мкг/мл. Затем эмбрион трижды отмывали раствором Хэнкса с канамицином (50 мкг/мл). Вскрыв брюшную полость эмбриона, извлекали печень и снова трижды промывали ее раствором Хэнкса с канамицином в концентрации 50 мкг/мл. Печень помещали в смесь трипсина и версена в соотношении 1:1 и инкубировали в термостате при 37 °С 25—30 мин. По окончании инкубации смесь трипсин:версен удаляли с последующим промыванием печени раствором Хэнкса.

Печеночную ткань суспендировали в среде без сыворотки, подсчитывали количество клеток в камере Горяева и переносили в чашки Петри диаметром 40 мм. Посевная доза составляла $1 \cdot 10^6$ клеток на чашку.

© Е. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш, С. В. Подольская, А. Д. Швед, А. И. Смикодуб, 1995

Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, в стандартной ростовой среде.

Среды для культивирования гепатоцитов: 1) Игла с глютамином, 40 %; 2) гидролизат лактальбумина, 40 %; 3) эмбриональная телячья сыворотка, 20 %; 4) канамицин, 50 мкг/мл.

Через 24 ч клетки пересевали. В последующем пересевы осуществляли по достижении клетками монослоя.

Эффективность метода оценивали по количеству живых клеток при окрашивании 0,3 %-м трипановым синим и ростовым способностям культивируемых клеток (прирост клеток; число пассажей).

Результаты и обсуждение. Исследование жизнеспособности изолированных гепатоцитов показало, что доля живых клеток при переводе их в культуру была выше 90 % (более высокий процент, чем при использовании других способов выделения).

Изолированные клетки сохраняли хорошие ростовые свойства при культивировании. По достижении монослоя их пересевали в соотношении 1 : 2 на стеклянную или пластиковую посуду. Длительность культивирования на стандартной среде составляла 12—14 дней. В течение этого времени эмбриональные гепатоциты пассировали 3—4 раза, при этом общее количество клеток в культуре увеличивалось более чем в 8—10 раз относительно первоначальной посевной дозы.

Был осуществлен стандартный гистологический и гистохимический анализ полученных эмбриональных гепатоцитов. Из печени эмбрионов человека 8—12-недельного возраста были приготовлены и исследованы мазки, парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином-эозином, проведена PAS-реакция по методике Мак-Мануса. Аналогично проанализированы пробы культур эмбриональных гепатоцитов. Было показано наличие 90 % гепатоцитов в препаратах культур печени 8-недельных эмбрионов непосредственно после выделения и сохранение высокого процента гепатоцитов при последующем культивировании.

Таким образом, предлагаемый способ получения эмбриональных гепатоцитов человека прост в применении и может быть использован в биотехнологии, генной терапии, трансплантологии, вирусологии и др. областях, а также позволяет создать максимально приближенную к человеку модельную клеточную систему для экспериментальных исследований.

Авторы выражают благодарность М. П. Ковальскому и Т. А. Кретовой за гистологические и гистохимические исследования эмбриональных гепатоцитов и их культур.

О. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш, С. В. Подольска, А. Д. Швед, А. И. Смикодуб

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ГЕПАТОЦИТІВ ЛЮДИНИ

Резюме

Описано простий метод виділення ембріональних гепатоцитів людини, який дозволяє одержувати до 90 % життєздатних клітин. Печінку обробляли ферментативно-механічним способом та культивували при 37 °С в атмосфері 5 % CO₂ протягом 12—14 днів.

H. M. Sukhorada, L. L. Lukash, S. V. Podolskaya, A. D. Shved, A. I. Smykodub

THE WAY OF RECEIVING AND CULTIVATING OF HUMAN EMBRYONIC HEPATOCYTES

Summary

A simple method of giving of human embryonic hepatocytes have been described. It allows to receive up to 90 % cells of great vitality. Liver was treated by fermental-mechanic way and cultivated at the temperature of 37 °C in the 5 % CO₂ atmosphere during 12—14 days.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фрешин Р. Культура животных клеток. Методы.— М.: Мир, 1989.— 333 с.
2. Блюжкин В. М., Скалецкий Н. Н., Бабикова Р. А. и др. Получение культур из печени эмбрионов человека // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1988.— 105, № 2.— С. 212—214.
3. Гичев Ю. П., Граудиня Ж. П. Культура ткани печени в гепатологии.— Новосибирск: Наука, 1986.— 88 с.
4. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени // Эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование.— Киев: Наук. думка, 1988.— 192 с.
5. А. с. 1601222. Способ получения гепатоцитов / Н. А. Онищенко, М. А. Данилов С. Д. Артамонов.— Оpubл. 08.05.1990.
6. Эрайзер Т. Л., Гринберг К. Н., Ворсанова С. Г. Характеристика эмбриональных гепатоцитов человека, культивируемых *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1975.— 49, № 5.— С. 123—125.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 05.09.94