

**СФЕРОИДНЫЕ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ  
МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ**  
**HEPATOCYTES SPHEROID CULTURES OBTAINED  
BY LIVER ENZYMATIC DISPERSION**

**М. Ю. Юркевич, П. В. Альховик, М. В. Лобай,  
А. Д. Дубко, Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская**  
**M. Yurkevich, P. Alchovik, M. Labai, A. Dubko, D. Nizheharodava, M. Zafranskaya**

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
marija4567@gmail.com*

*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

Представлен оптимизированный метод выделения гепатоцитов, включающий механическое и ферментативное диспергирование ткани, фильтрование полученной суспензии и кратковременное низкоскоростное центрифугирование. Показано, что культивирование гепатоцитов на неадгезивном пластике способствует формированию сфероидов с многочисленными межклеточными связями, защищающими клетки от апоптотической гибели и тем самым поддерживающие жизнеспособность культур. При этом, изначальная высокая интенсивность хемилюминесценции гепатоцитов при культивировании снижается, что требует разработки дополнительных технологий поддержания функциональной стабильности клеток.

An optimized method for hepatocytes isolation including mechanical and enzymatic tissue dispersion, suspension filtration and short-term low-speed centrifugation is presented. It was shown that the cultivation of hepatocytes on non-adhesive plastic promotes the formation of spheroids with numerous intercellular bonds that protect cells from apoptotic death and support the viability of cultures. At the same time, the initial high intensity of hepatocyte chemiluminescence during cultivation decreases which requires the development of additional technologies to maintain the functional stability of cells.

*Ключевые слова:* гепатоциты, ферментативное диспергирование, сфероиды, морфология, жизнеспособность, хемилюминесценция.

*Keywords:* hepatocytes, enzymatic dispersion, spheroids, cell morphology, viability, chemiluminescence.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-198-201>

Печень является центральным метаболическим и синтетическим органом, участвующим в эмбриональном гемопоэзе, метаболизме углеводов (глюконеогенез, гликогенолиз), синтезе липидов и белков (альбумин, глобулин, факторы свертывания крови, трансферрин и др.), продукции желчных кислот, хранении гликогена и ретинола, детоксикации метаболитов, токсинов, гормонов и лекарственных средств. Кроме того, печень имеет высокую скорость самообновления и значительную способность к восстановлению после редукции до 80% массы органа [1]. Функциональная гетерогенность печени, а также способность после повреждения поддерживать свою структуру связаны с уникальными свойствами ее паренхиматозных эпителиальных клеток – гепатоцитов и холангиоцитов. Гепатоциты составляют 78% от объема печени и более чем 65% от числа клеток, при этом зрелые клетки находятся в состоянии покоя ( $G_0$  – фаза клеточного цикла), но в ответ на повреждение или при удалении части печени запускаются механизмы, обеспечивающие пролиферацию гепатоцитов с целью компенсации погибших клеток [2].

Получение культур гепатоцитов является достаточно распространенной технологией, используемой в клеточной биологии, фармакологии и токсикологии для изучения метаболических процессов, оценки жизнедеятельности и функциональной активности клеток, исследовании фармакологического (токсического) действия различных факторов химической и физической природы, доклинической оценки эффективности гепатопротекторных средств [3]. В настоящее время рассматриваются возможности использования культур гепатоцитов в терапии острой печеночной недостаточности, хронических заболеваний печени, наследственных и приобретенных метаболических нарушений [2].

Основными проблемами культивирования гепатоцитов являются снижение выхода и жизнеспособности клеток при выделении, быстрая потеря в культурах кубоидной морфологии и специфических функций, аккумуляция актиновых волокон, приобретение фибробластоподобной морфологии, адгезивных свойств и гибель в течении нескольких дней [4]. Данные изменения связаны с ишемическим стрессом во время выделения клеток и их адаптацией к лабораторным условиям, а также с отсутствием условий для прикрепления гепатоцитов и формирования межклеточных контактов вследствие разрушения архитектоники ткани.

В связи с этим, активно разрабатываются подходы к культивированию гепатоцитов, основанные на использовании различных питательных сред и дополнительных факторов (альбумин, онкостатин, дексаметазон, никотинамид, диметилсульфоксид, L-аскорбиновая кислота, инсулин, факторы роста и др.), вариантов культивирования (монослойные, сфероидные культуры, сэндвич-культивирование, трехмерные культуры методами инкапсуляции, наложения или печати ткани и др.). В случае плоской монослойной культуры гепатоциты, как и любые клетки, теряют организацию и естественные связи с экстрацеллюлярным матриксам и другими компонентами ткани. Культивирование гепатоцитов в сфероидах способствует стабилизации функций и пролонгирует время жизни, что обеспечивается непрерывным потоком питательных веществ, кислорода и формированием межклеточных связей во всех направлениях [2].

Целью данного исследования являлась разработка технологий выделения и культивирования гепатоцитов, а также изучение морфофункциональных свойств сфероидных клеточных культур.

Экспериментальное исследование проводили с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.), и в соответствии с постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21.05.2010 № 36 «Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках».

Объектами исследования являлись первичные культуры гепатоцитов, полученные от 3 беспородных половозрелых лабораторных крыс с массой тела 270 – 320 г. Лабораторных животных вводили в наркоз путем интракардиального введения раствора тиопентала натрия (45 мг/кг веса) и проводили продольную лапаротомию. Для предотвращения тромбообразования в воротную вену печени вводили физиологический раствор (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), содержащий 500 Ед/мл гепарина натрия (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь). После иссечения связочного аппарата и магистральных сосудов извлекали долю печени, промывали в растворе Рингера – Локка (ОАО «Белзоветснабпром», Республика Беларусь), механически измельчали до эксплантов объемом 1 – 2 мм<sup>3</sup> в фермент-содержащем растворе и инкубировали в течение 20 мин при 37°C в условиях постоянного перемешивания. Для ферментативного диспергирования ткани использовали 0,01% (вариант 1) и 0,05% (вариант 2) растворы коллагеназы IV типа («Sigma», Германия), а также комбинацию 0,01% раствора коллагеназы и 1 мг/мл протеазы (вариант 3). Ферментативную активность инактивировали путем центрифугирования полученных суспензий в физиологическом растворе с 20% инактивированной фетальной бычьей сывороткой (ФБС, «Capricorn Scientific», Германия) в течение 5 мин. при 50 g. К осадкам добавляли физиологический раствор с 5% ФБС, суспензии пропускали через фильтры с диаметром пор 100 мкм и дважды центрифугировали 5 мин. при 50 g. В ряде проб для удаления нежизнеспособных клеток и дебриса использовали дополнительный этап, заключающийся в центрифугировании клеточной суспензии на 25% забуференном перколле («ChemCruz», США, 20 мин, 52g). Частоту клеточной суспензии и жизнеспособность оценивали на каждом этапе методами световой и флуоресцентной микроскопии.

Клетки культивировали при 37°C в условиях 5% CO<sub>2</sub> на чашках Петри для суспензионных культур («Corning», США) в питательной среде DMEM/F12 («Gibco», США), содержащей 10% ФБС, 1% инактивированной сыворотки крысы, 100 нМ дексаметазона, 2мМ L-глутамин, 20 нг/мл рекомбинантного фактора роста эндотелиоцитов (rEGF), 100 Ед/мл бензилпенициллин натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата, 100 Ед/мл неомицин сульфата («Lonza», США). Концентрация клеток для посева составляла 1x10<sup>5</sup> жизнеспособных гепатоцитов/см<sup>2</sup>. Замена половины объема культуральной среды осуществлялась каждые 48 часов. Все манипуляции с клетками выполняли со строгим соблюдением правил стерильности в ламинарном боксе II класса защиты (ОДО «Белаквилон», Республика Беларусь).

Для мониторинга клеточных культур и визуализации роста *in vitro* использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп BS – 7000 («BestScope», КНР). Жизнеспособность оценивали с помощью флуоресцентного красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (1 мкг/мл DAPI, «Sigma», Германия). Кроме того, суспензию гепатоцитов окрашивали пропидий йодидом и антителами к аннексину V, меченными флуоресцеином (набор реактивов «ANNEXIN V - FITC APOPTOSIS DETECTION KIT2, «BD Pharmingen», США) с регистрацией результатов на проточном цитометре CytoFLEX («Beckman Coulter», США).

Хемиллюминесцентную (ХЛ) активность гепатоцитов регистрировали сразу после выделения, на 1, 2 и 4 дни культивирования на приборе LUM – 100 (РФ). Уровень спонтанной хемиллюминесценции определяли в течение 20 мин. в пробе, содержащей 6,4x10<sup>4</sup> клеток/0,4 мл среды DMEM/F12. Люминолзависимую хемиллюминесценцию оценивали в течение 20 мин. путем добавления к клеточной суспензии люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион) в конечной концентрации 1мМ. Для характеристики хемиллюминесценции клеток рассчитывали коэффициент усиления (K<sub>ус</sub>), отражающий во сколько раз увеличивается интенсивность свечения после добавления к суспензии интактных клеток люминола.

В настоящее время наиболее широко используется метод выделения гепатоцитов, основанный на перфузии печени бескальциевыми или кальций-хелатирующими растворами (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, цитрат, оксалат) с целью ослабления кальций-зависимых межклеточных контактов и последующей ферментативной обработкой паренхимы (коллагеназа II и IV типов, гиалуронидаза, протеаза XIV типа, диоксирибонуклеаза). Основными недостатками метода двухстадийной перфузии являются большой расход реактивов, сложность хирургического вмешательства, необходимость наличия достаточного объема ткани, которая должна быть обязательно инкапсулирована и содержать сосуды, удобные для катетеризации. Кроме того, данный подход подразумевает достаточно сложный подбор адекватных режимов и продолжительности перфузии, а также необходимость постоянного поддержания стабильного перфузионного потока [2, 4].

В качестве прототипа нами использовался метод бесперфузионного выделения гепатоцитов, предложенный Ch. J. Green и соавт. в 2017 г. [5]. При этом оценивалась эффективность различных подходов к ферментативному диспергированию ткани, режимов центрифугирования и необходимость добавления этапа центрифугирования на градиенте плотности. Показано, что обработка ткани печени бескальциевыми или кальций-хелатирующими растворами существенно не влияло на клеточный выход, при этом снижало жизнеспособность гепатоцитов и частично повреждало их плазматическую мембрану. Для эффективного ферментативного диспергирования ткани оптимальным являлось использование 0,01% раствора коллагеназы, тогда как более высокая концентрация фермента, как и комбинация 0,01% коллагеназы и протеазы способствовали клеточной гибели. Добавление этапа фильтрования суспензии через поры диаметром 100 мкм в сочетании с кратковременным низкоскоростным центрифугированием (5 – 8 мин., 50 g) эффективно обеспечивало удаление эритроцитов, клеточного дебриса и поврежденных клеток без необходимости центрифугирования полученной суспензии на градиенте плотности. Гепатоциты с разрушенными мембранами, непаренхиматозные клетки печени и эритроциты значительно легче, чем неповрежденные гепатоциты. В связи с этим, жизнеспособные гепатоциты седиментировали при низких скоростях, тогда как другие клетки оставались в надосадочной жидкости.

Количество жизнеспособных (негативных по аннексину V и пропидий йодиду) клеток, выделенных методом ферментативного диспергирования ткани печени 0,01% раствором коллагеназы в сочетании с фильтрованием клеточной суспензии и низкоскоростным центрифугированием, колебалось от 83,0% до 95,6%.

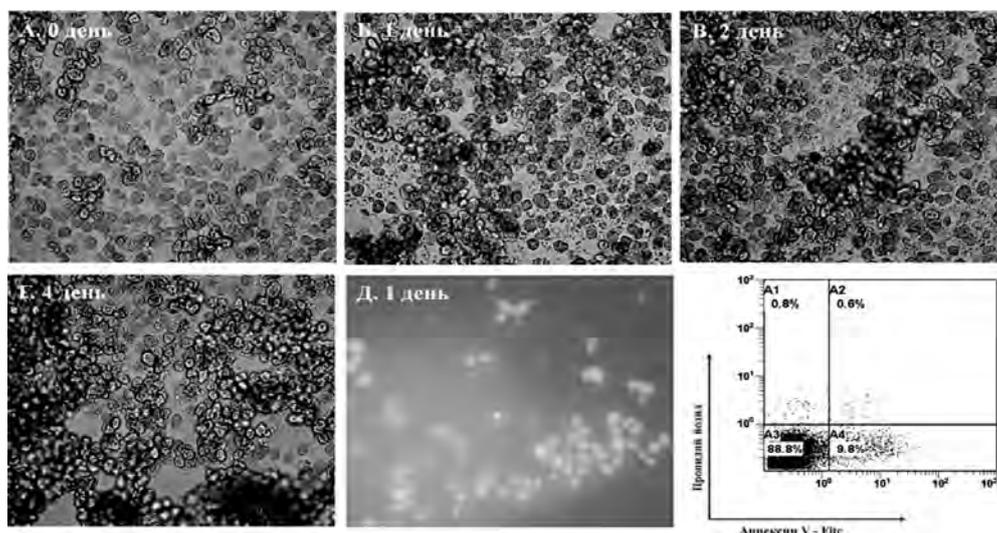


Рисунок 1 – Морфология (А – Г) и жизнеспособность (Д и Е) сфероидных культур гепатоцитов: А – Г – световая микроскопия, ув. 20х; Д – окраска DAPI, флуоресцентная микроскопия, ув. 20х; Е – репрезентативные данные проточной цитометрии

Изолированные гепатоциты культивировали в многокомпонентной питательной среде DMEM/F12 в виде суспензии сфероидов (рис.1 А – Е). Добавление дексаметазона и эпидермального фактора роста в культуральную среду повышало жизнеспособность и устойчивость гепатоцитов. В сфероидных культурах, наряду с типичной кубоидной морфологией, большинство клеток имело округлую форму, что не характерно для постнатальной печеночной ткани и встречается в случае активации регенеративных процессов. Размер гепатоцитов, определяемый как максимально возможное расстояние между двумя точками видимой на фотографии клеточной проекции, на первые сутки культивирования варьировал от 19 мкм до 33 мкм (в среднем  $28 \pm 3$  мкм). При более длительном культивировании образовывались конгломераты гепатоцитов за счет формирования избирательных межклеточных контактов, сопоставимых с контактами в исходной ткани. Однако, данные многоклеточные конгломераты не были достаточно устойчивыми и в течение всего времени культивирования (до 5 суток) легко откреплялись механическим пипетированием. Жизнеспособность гепатоцитов через 24 часа культивирования варьировала от 80,4% до 92,0% (рис. 1Д и Е) и сохранялась на данном уровне до 5 суток.

После выделения гепатоциты имели достаточно высокую интенсивность собственной хемилюминесценции (рис. 2), при этом добавление химического активатора – люминола усиливало свечение в  $38,60 \pm 0,19$  раз ( $K_{yc}$ ). Через 24 часа культивирования интенсивность хемилюминесценции снижалась, коэффициент усиления составлял  $3,89 \pm 0,06$  раз и незначительно изменялся на протяжении 5 дней культивирования ( $K_{yc}$  на 2 сутки культивирования –  $2,92 \pm 0,08$  раз,  $K_{yc}$  на 4 сутки –  $2,11 \pm 0,04$  раз).

Снижение хемилюминесцентной активности жизнеспособных культур может быть связано с адаптацией клеток к условиям *in vitro*, кроме того функционирование гепатоцитов определяется целым рядом факторов, включая близлежащие клетки, экстрацеллюлярный матрикс, растворимые факторы. В связи с этим, перспективным направлением является разработка технологий совместного культивирования сфероидов гепатоцитов с различными типами клеток: фибробластами, мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, эндотелиоцитами пуповинной вены, непаренхиматозными клетками печени и т.д. При использовании данного подхода

осуществляется *in vitro* нутритивная поддержка гепатоцитов, а также обеспечивается формирование межклеточных контактов. Кроме того, сфероидные культуры могут рассматриваться как «строительный блок» для *de novo* синтезируемых тканей. Для этого возможна инкорпорация сфероидов в природные или синтетические матричные слои (гидрогель, коллаген, хитин, хитозан, полимеры молочной кислоты, полигликолевая кислота и т.д.), а также в состав многокомпонентных тканеинженерных конструкций (децеллюляризированный скаффолд печени).

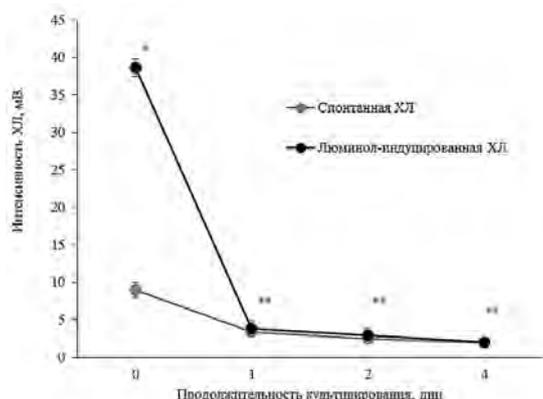


Рисунок 2 – Интенсивность спонтанной и люминол-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) культур гепатоцитов (\* –  $p < 0,05$  по сравнению со спонтанной ХЛ, U-критерий Манна-Уитни; \*\* –  $< 0,05$  по сравнению с уровнем ХЛ на 0 день, критерий Вилкоксона)

Метод, основанный на механическом диспергировании интактной ткани печени и обработке эксплантов 0,01% раствором коллагеназы IV типа в сочетании с фильтрованием полученной суспензии (диаметр пор 100 мкм) и кратковременным низкоскоростным центрифугированием (5 – 8 мин, 50 g), позволяет выделить достаточное количество жизнеспособных, морфологически целостных гепатоцитов. При культивировании гепатоцитов на неадгезивном пластике формируются жизнеспособные сфероиды, имеющие многочисленные межклеточные контакты и напоминающие организацию печени при регенерации. Изолированные гепатоциты обладают высокой интенсивностью свечения в реакциях спонтанной и люминол-индуцированной хемилюминесценции, тогда как по мере культивирования, данная способность снижается.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ в рамках гранта №М19АРМ-016 от 02.05.2019.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев, Е. В. Биологическая искусственная печень / Е.В. Григорьев, Г.П. Плотников, Д.Л. Шукевич, А.С. Головкин // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – №4. – 2014. – С. 70 – 80.
2. Li, Y. Isolation and cultures of primary hepatocytes / Y. Li, M. Gao et al. // J. Clin. Exp. Pathol. – Vol.7, Iss. 5. – 2017.
3. Скуратов, А. Г. Выделение изолированных гепатоцитов / А.Г. Скуратов, Д.Р. Петренев // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – № 4 (38). – С. 114 – 118.
4. Shulman, M. Long-term culture and co-culture of primary rat and human hepatocytes / M. Shulman, Y. Nahmias // Methods Mol Biol. – 2013. – V. 945. – P. 287 – 301.
5. Green, Ch. The isolation of primary hepatocytes from human tissue: optimizing the use of small non-encapsulated liver resection surplus / C.J. Green, C.A. Charlton, L.M. Wang [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2017. – V.18. – P. 597 – 604.