

И. Р. Евдокимов, И. В. Фролькис

ВЫРАЩИВАНИЕ МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЫ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Клетки различных органов, выращенные в культуре тканей, широко изучаются многими исследователями. При этом исследователь получает возможность изучать свойства и реакции на воздействие различных факторов одиночных, изолированных клеток. Влияние на исследуемую клетку других клеток и нервных окончаний той же ткани, таким образом, может быть сведено к минимуму и даже исключено. Большинство исследователей считают, что клетки различных тканей сохраняют, в основном, соответствие той ткани, из которой они были выращены [6, 7, 8]. Некоторые из этих соображений подтверждаются и нашими исследованиями [1, 2]. Несмотря на большое число исследований на клетках различных тканей, выращенных в культуре, гладкомышечные клетки сосудов в этих условиях изучены мало. Основная часть таких экспериментов выполнена на клетках аорты различных животных [4, 7—10]. В связи с этим необходимо было для своих исследований разработать приемы ферментативной дезагрегации гладкой мышцы воротной вены крысы и выращивания ее гладкомышечных клеток в монослойной культуре. Клетки такой культуры являются достаточно удобным объектом для электрофизиологических, биохимических, морфологических исследований. На монослойных культурах возможно изучение процесса образования межклеточных связей и исследование их особенностей.

В связи с большим объемом соединительной ткани гладкие мышцы сосудов гораздо труднее поддаются дезагрегации, чем ткани сердечной мышцы, печени и др. В наших экспериментах мы отказались от использования ткани новорожденных животных или эмбрионов, поскольку клетки новорожденных крысят и взрослых животных значительно отличаются по ряду свойств. В то же время гладкомышечные клетки сосудов весьма чувствительны к воздействию ферментов, вследствие чего при дезагрегации ткани недопустимо применение высоких концентраций энзимов. В результате поисков оптимального возраста мы остановились на двух-трехнедельных крысятах, как наиболее отвечающих поставленным условиям. Ткань воротной вены у животных этого возраста функционально полноценна, а гладкая мышца реагирует на воздействие различных биологически активных веществ так же, как и соответствующая мышца взрослого животного.

Наиболее широкое применение для ферментативной дезагрегации различных тканей получил трипсин [3, 5]. Было проведено [5] сравнительное изучение действия различных протеолитических ферментов — трипсина, папаина, фицина, проназы, коллагеназы и гиалуронидазы на мышцы и был сделан вывод о том, что трипсин и проназа являются наиболее пригодными ферментами для выделения мышечных клеток. Руководствуясь этим мы использовали трипсин марки Спофа (ЧССР). Эксперименты по действию трипсина проведены в широком диапазоне концентраций от 0,01 до 1,0 %. Установлено, что выход живых клеток в суспензии зависит от концентрации фермента — с повышением концентрации трипсина до определенного предела выход клеток возрастает, дальнейшее увеличение концентрации приводит к уменьшению количества клеток в суспензии. Выявлено, что 0,3 % концентрация трипсина оптимальна для гладкой мышцы воротной вены крысят в возрасте 2—3 нед.

Трипсин разводили на сбалансированном солевом растворе, лишенном двухвалентных ионов. Его состав (в ммоль) был следующим: NaCl — 136,8; KCl — 5,4; NaHCO₃ — 4,7; глюкоза — 0,56; трис HCl, pH раствора трипсина поддерживали в пределах 7,30 — 7,35.

Забор тканей для исследования производили в боксированном помещении. Для забора ткани животных предварительно обрабатывали спиртом. Брюшную полость вскрывали послойно со сменой стерильных инструментов. Фрагменты воротной вены

иссекали после отделения сосуда вальном столике под тем ткань измельчали тативной обработке.

Существующие [10] в ряде случаев изменения суспензии глад

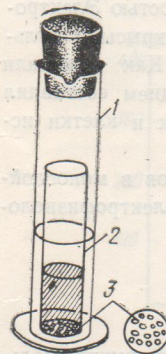


Рис. 1. Трипси

Рис. 2. Микрофотогра

необходимо избежать т и центрифугирование. для дальнейшего выра от обрабатываемой тк с одной стороны явля нейшем культуры, а с

Во избежание эт Внутри большого поме отверстий в сетке под клетки и не могут пр мягкая и щадящая, ос достигнуть при механи способом можно получ ткани. Значительно у жизнеспособность. Экс ротной вены крысят, что клетки находятся

Из одной навески зии. Экспериментальн в растворе трипсина, г точным, и ткань разде ные агрегаты; при уве уменьшался, по-видим ткани для получения

иссекали после отделения от жировой клетчатки и сопутствующих сосудов. Дальнейшее освобождение сосуда от жировой клетчатки и адвентиции производилось на препаровальном столике под визуальным контролем с помощью специального увеличителя. Затем ткань измельчали, переносили в трипсинизационный сосуд и подвергали ферментативной обработке.

Существующие классические приемы обработки тканей с помощью ферментов [3, 10] в ряде случаев оказываются мало пригодными. Это объясняется тем, что для получения суспензии гладкомышечных сосудистых клеток от сравнительно молодых крысят

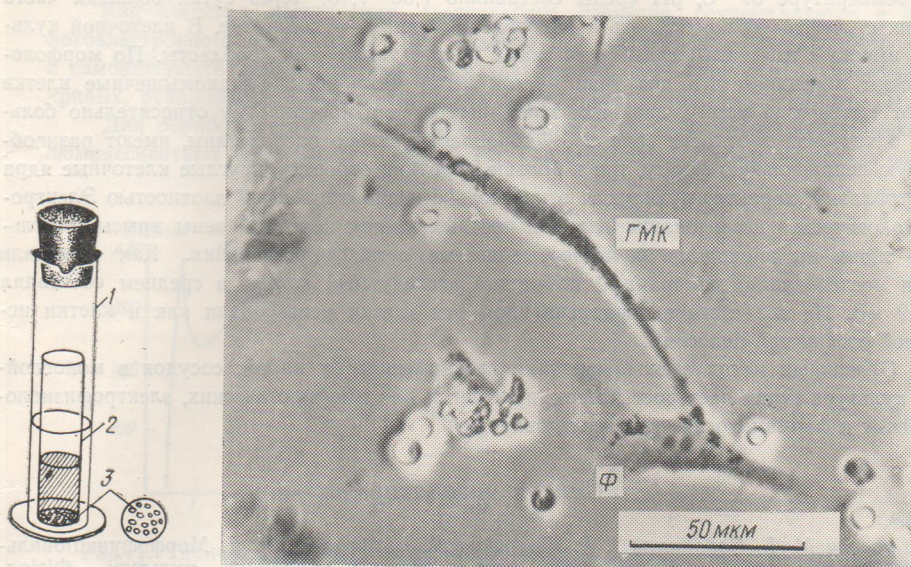


Рис. 1. Трипсинизационное устройство для получения суспензии клеток.

1 — наружный цилиндр, 2 — внутренний цилиндр, 3 — сетка.

Рис. 2. Микрофотография гладкомышечной клетки (ГМК) сосуда, контактирующей с фибробластом (Ф) в культуре тканей.

необходимо избежать таких травматичных приемов, как обработка в магнитной мешалке и центрифугирование. В противном случае суспензия будет практически малоприспособной для дальнейшего выращивания культуры. Кроме того в процессе отделения суспензии от обрабатываемой ткани мелкие частицы ткани попадают в посадочный материал, что с одной стороны является причиной нарушения монослойности выращиваемой в дальнейшем культуры, а с другой — значительно уменьшает полезный выход суспензии.

Во избежание этого нами применено устройство, состоящее из двух цилиндров. Внутри большего помещается цилиндр с плоским дном в виде сетки (рис. 1). Диаметр отверстий в сетке подобран таким образом, что в них свободно проходят отдельные клетки и не могут проникать кусочки тканей. Ручная обработка в таком устройстве мягкая и щадящая, осуществляется медленными плавными встряхиваниями, чего нельзя достигнуть при механической обработке на магнитной мешалке и в центрифуге. Таким способом можно получить достаточно чистую суспензию, мало загрязненную кусочками ткани. Значительно увеличивается количество получаемых в суспензии клеток и их жизнеспособность. Эксперименты, проведенные нами на гладкомышечных клетках воротной вены крысят, выращенных из суспензии, полученной этим способом, показали, что клетки находятся в удовлетворительном функциональном состоянии.

Из одной навески ткани, полученной от 10 крысят, выделяли 6 — 8 порций суспензии. Экспериментальным путем было найдено оптимальное время экспозиции ткани в растворе трипсина, при уменьшении этого времени воздействие оказывалось недостаточным, и ткань разделялась не полностью, не на изолированные клетки, а на клеточные агрегаты; при увеличении времени экспозиции выход изолированных клеток также уменьшался, по-видимому, в связи с повреждением их ферментом. Время обработки ткани для получения первой порции составляло 20 мин; для последующих — 5 мин.

Ферментативная обработка проходила в термостате при температуре 37 °С. Первая порция не использовалась, так как в ней содержится много эритроцитов и мелких неклеточных элементов. Следующие порции были пригодны для посадки культуры. Ингибирование трипсина осуществляли добавлением в суспензию сыворотки крупного рогатого скота. Гладкомышечные клетки воротной вены крысы выращивали на покровных стеклах, предварительно обезжиренных в смеси спирта с эфиром, в специальных флаконах, которые закрывались резиновыми пробками. Культивирование производилось в среде 199 с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (20 %) в термостате при температуре 37 °С, pH среды составляло 7,35—7,45. Через сутки большая часть клеток суспензии прикреплялись к покровным стеклам — подложке. В клеточной культуре вместе с гладкомышечными клетками растут также и фибробласты. По морфологическим признакам эти два типа клеток легко различимы. Гладкомышечные клетки имеют вытянутую форму, овальные клеточные ядра и протоплазму относительно большой оптической плотности (рис. 2). Фибробласты сильно распластаны, имеют разнообразную неправильную форму, три и больше коротких отростка, круглые клеточные ядра и цитоплазму, характеризующуюся относительно низко оптической плотностью. Электрофизиологические исследования гладкомышечных клеток воротной вены крысы в культуре ткани мы проводили на четвертые-шестые сутки выращивания. Как показали наши исследования, мембранный потенциал исследуемых клеток в среднем составлял 38 ± 9 мВ. На воздействие норадреналином эти клетки реагировали как и клетки исходной сосудистой полоски.

Описанный метод культивирования гладкомышечных клеток сосудов в монослойной культуре ткани дает рост клеток, пригодных для морфологических, электрофизиологических и фармакологических исследований.

Список литературы

1. Гуревич М. И., Евдокимов И. Р., Барченко Л. И., Майська О. Д. Морфофункциональная характеристика гладкомышечных клеток судин у тканевой культуры. — Физиол. журн., 1974, 20, № 2, с. 182—187.
2. Евдокимов И. Р., Барченко Л. И., Фролькис И. В., Веселовский Н. С. Электрофизиологические свойства и ультраструктура гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, выращенных в культуре ткани. — Физиол. журн. СССР, 1978, 64, № 6, с. 795—801.
3. Пол. Д. Культура клеток и тканей. М.: Медгиз, 1963. 346 с.
4. Blaes N., Bourdillon M., Crouzet B. et al. Action de l'adrenalin sur la proliferation de cellules musculaires lisses de media aortique de rat en culture. — C. r. Acad. Sci., 1980, D290, N 12, p. 783—786.
5. Byscher R. Enzymatic liberation of myogenic cells from adult rat muscle. — Anat. Res., 1974, 180, N 7, p. 645—661.
6. Campbell G. R., Chamley-Campbell J. H. Role of smooth muscle cells in atherogenesis. — Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol., 1980, 7, N 1, p. 83.
7. Harder H. R., Sperelakis N. Action potential of rat aortic smooth muscle cells in tissue culture. — Blood Vessels, 1979, 4, N 16, p. 186—201.
8. Mauger G. P., Worcel M., Tassin G., Courtion Y. Contractility of smooth muscle cells of rabbit aorta in tissue culture. — Nature, 1975, 255, N 5506, p. 337—338.
9. Moskalewski S., Korwinski M., Hinek A. In vitro elastic fibre formation by aggregated aortic cells of newborn rabbits. — Anat. and Embryol., 1976, 150, N 1, p. 113—122.
10. Ross R. The smooth muscle cells. 2. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibres. — J. Cell. Biol. 1971, 50, N 1, p. 172—182.

Институт физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
16.II 1981 г.

Как извест
фотоэлектронног
с самопишущего
кривых, отража
Для обраб
люминесцентных

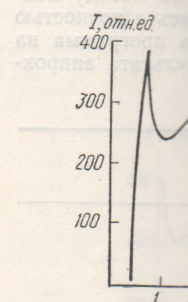


Рис. 1. Типич

По горизонтали

Кружочек — экс

метров сверхслаб
однако, имеет р
бует большой за
чений кривой; не
В связи с э
минесцентных кр
Работы по
и ранее. Наприм
созданные специа
исследования эн
[2] и др.

Мы изучали
стандартных фун
колебания парам
интактных живот
кинетики сверхсл
процесса можно
тики функционал

Исследовали
после добавления
породных крысах
На начальн
ской функции, отр