

УДК 577.3.08

П. Г. Богач, Н. В. Куликова, В. Л. Зима

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Известно несколько способов получения суспензии изолированных гладкомышечных клеток и описан их анализ. Эти методики отличаются отсутствием сильных механических воздействий на клетки. Полученные изолированные клетки сохраняют нормальное функциональное состояние и пригодны для физиологических исследований. Методика выделения интактных сокращающихся сердечных клеток с применением коллагеназы и трипсина разработана [6] и модифицирована для гладких мышц холодно-



Суспензия изолированных гладкомышечных клеток. Фазовый контраст, увеличение $\times 240$.

кровных [1] и теплокровных [4] организмов. Изолированные клетки были выделены из мышц желудка лягушки [1], второго желудка цыпленка, *taenia coli* и *vas deferens* морской свинки [2—5].

Метод исследования изолированных клеток позволяет обойти трудности работы с гладкомышечной тканью; кроме того, он позволяет ответить на вопрос о том, какова функциональная природа организации гладкой мышцы и чем функционирование отдельных гладкомышечных клеток отличается от клеток, объединенных в ткань. Ведь результаты, полученные при изучении интактной ткани, отображают следствия сложной организации гладкомышечных клеток в многоклеточный комплекс. Важное преимущество метода состоит в том, что на изолированных клетках можно наблюдать динамику сокращения. Кроме того, исследование всей клетки позволяет наблюдать в какой-то мере трехмерность процессов.

В настоящей работе приведено описание нескольких модифицированных нами способов получения суспензии изолированных гладкомышечных клеток, а также их анализ.

В наших экспериментах использовали ткань *taenia coli* мочеточников и желудка морской свинки. Модификация описанных методик [2, 4] позволила значительно увеличить выход изолированных клеток.

Для выделения использовались следующие растворы (в ммоль). 1) Модифицированный раствор Хэнкса: 130 NaCl, 5 KCl, 1,1 Na₂HPO₄, 0,4 KH₂PO₄, 4,0 NaHCO₃, 5,5 глюкоза, ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ отсутствуют; 2) 130 NaCl, 5 KCl, 4,0 NaHCO₃, 5,5 глюкоза, 4,0 CaCl₂.

Растворы готовили на гистидиновом буфере, pH 7,3 при 36 °C. Использованы три (A, B, C) методики выделения изолированных клеток.

A. Взятую у животного ткань тщательно промывали раствором 1 (4 °C), разрезали на кусочки размером 0,5—1 мм, в течение 1—1,5 ч выдерживали при 20 °C в растворе 1, в который был добавлен ЭГТА (0,3—0,5 мг/мл). Затем кусочки ткани переносили в бюкс с остекленным магнитом и заливали 10 мл свежеприготовленного раствора трипсина («Дифко», США) в концентрации 1 мг/мл. Бюкс помещали в термостат (36 °C)

на магнитную мешалку при вращении магнита со скоростью 1 об/с. Через 1 ч переваривание ингибиравали соевым ингибитором трипсина (3 мг/мл, 10 мин). Затем раствор трипсина заменяли раствором коллагеназы (0,4 мг/мл, приготовлен на растворе 2). Через 30—40 мин клеточную суспензию осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 5—10 мин) и осадок, состоящий из изолированных клеток, ресуспендировали в растворе 1.

B. Процедура подготовки ткани такая же, как в методике *A*, но время инкубации ткани при 20°C увеличивали до 1,5—2 ч, а ЭГТА не добавляли. Кроме того, на первом этапе переваривания инкубационный раствор содержал не только трипсин, но и коллагеназу (0,03 мг/мл). После 45 мин переваривания раствор сливали, не добавляя соевый ингибитор, и заменяли раствором коллагеназы (1 мг/мл), приготовленным на растворе 2. Осажденные центрифугированием клетки ресуспендировали в растворе 1.

B. Ткань инкубировали при 20°C в течение 2,5 ч в растворе 1 с добавлением ЭГТА (0,3 мг/мл). Затем кусочки ткани заливали свежеприготовленным раствором трипсина и пепсина (1 мг/мл), приготовленным на растворе 1. Переваривание продолжалось 1—1,5 ч в термостате при 36°C. Затем ткань переносили в раствор проназы («Calbiochem», США, 0,5—1 мг/мл), приготовленный на растворе 2. Изолированные клетки выделялись примерно через 1,5 ч переваривания проназой.

Мы провели сравнительный анализ трех модификаций способов выделения изолированных клеток по следующим показателям: выход изолированных клеток (об этом судили по количеству клеток в поле зрения оптического микроскопа), форма и размер, сократительная способность клеток при действии ацетилхолина и K⁺ деполяризации.

При сравнении результатов применения трех модификаций методики выделения изолированных клеток следует отметить, что наибольший выход клеток дает применение методики *B*, а методика *A* дает наиболее активные клетки. Методика *B* дает хороший выход клеток, но время переваривания увеличивается почти вдвое. В наших исследованиях мы использовали преимущественно методики *A*, *B*. Результаты применения различных ферментов с указанием времени переваривания приведены в таблице.

При снижении температуры опыта с 37 до 32°C выход изолированных клеток увеличивался в несколько раз, но полученные при этом клетки были неактивными.

Ферментативное переваривание гладкомышечной ткани для получения изолированных клеток

Фермент и ингибитор	Время переваривания, мин		
	<i>taenia coli</i>	мочеточник	желудок
Коллагеназа	+	+	+
	40	15	75
Трипсин с коллагеназой	+	Лизис	+
	30		60
Трипсин	+	Лизис	+
	45		45
Трипсин и соевый ингибитор	+	Лизис	+
	60		90
Коллагеназа и 1 % сырьи-ворточный альбумин быка	+	+	—
	35		
Пепсин с трипсином	+	+	+
	60	45	75
Проназа	+	+	+
	60	70	85

«+»—переваривание идет, «—»—переваривания нет.

Полученные в экспериментах клеточные суспензии содержали смесь расслабленных и сокращенных клеток (см. рисунок). Клетки обладали различной конфигурацией. Некоторые из них были длинные веретенообразные, другие — слегка или сильно сокращенные, третьи были скрученны. Спонтанная сократительная активность клеток наблюдалась в 0,5—1 % случаев.

Длина клетки (нм), диаметр — (мкм) (диаметр — диаметр ядра), диаметр — (диаметр ядра + диаметр ядра и желудка) в мкм. Однако, зна- ткани мочеточник и ткани *taenia coli* отличаются по длине и диаметру.

Важным моментом является то, что изолированные клетки Бэгби и сотр. бран к супензии. Отсутствие окрашивания показывает, что клетки хорошо переносили окраску.

Важным фактором является то, что изолированные клетки Бэгби и сотр. бран к супензии. Отсутствие окрашивания показывает, что клетки хорошо переносили окраску.

Таким образом, наибольшим успехом можно считать минимальным содержание изолированных клеток, характеризующихся наличием ядра и отсутствием ядерного окрашивания и пригодными для дальнейшего использования.

1. Bagby R. M., Yarchoan J. A., et al. Isolation of smooth muscle cells from the rat mesentery. *J. Cell. Physiol.* 1973, 85, 333.
2. Fay F. S., Cooke H. J., et al. Isolation of smooth muscle cells. — In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973, 70, 3020.
3. Fay F. S., Delise J. A., et al. Isolation of smooth muscle cells from the rat mesentery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973, 70, 3020.
4. Small J. V. Contraction of smooth muscle cells. *Nature* 1955, N 5455, p. 324.
5. Small J. V., Squier J. C., et al. Isolation of smooth muscle cells from the rat mesentery. *J. Mol. Biol.* 1973, 70, 3020.
6. Vahouny G. C., et al. Isolation of smooth muscle cells from the rat mesentery. *J. Mol. Biol.* 1973, 70, 3020.

Киевский университет

ч переваре-
ем раствор
створе 2).
10 об/мин,
провали в
и инкуба-
того, на
тиски, но
не добав-
ленным
растворе 1.
авлением
растровом
в продол-
проназы-
рованные

ния изо-
ток (об
форма и
 Ca^{2+} депо-
щеления
т приме-
дает хо-
В наших
ны при-
едены в
клеток
ивными,

ч перева-
ем раствор
створе 2).
10 об/мин,
провали в
и инкуба-
того, на
тиски, но
не добав-
ленным
растворе 1.
авлением
растровом
в продол-
проназы-
рованные

Длина клеток колебалась от 250 до 90 мкм (в зависимости от степени сокращения), диаметр — от 10 до 30 мкм. Для этих трех видов ткани (*taenia coli*, мочеточника и желудка) в случае применения одной и той же методики (A или B) наблюдались, однако, значительные различия во времени выхода изолированных клеток: из ткани мочеточника они выделялись уже через 15 мин переваривания коллагеназой, из ткани *taenia coli* — через 30—40 мин, желудка — 1—1,5 ч (см. таблицу). Эти различия, очевидно, обусловлены плотностью соединительнотканых волокон в образцах.

Важным моментом исследования было определение жизнеспособности полученных изолированных клеток. В этом мы руководствовались критериями, разработанными Бэгби и сотр. [1], Фэем и сотр. [2]. Для пробы на повреждение клеточных мембран к супензированным клеткам добавляли 1% трипановый синий в растворе 1. Отсутствие окрашивания у 90% клеток показывало, что практически все клетки хорошо переносили изолирование.

Важным доказательством того, что сократительный аппарат клеток не повреждается в процессе изолирования, является способность клеток реагировать на K^+ , ацетилхолин и другие вещества. При воздействии больших концентраций KCl (0,3—0,5 моль) клетки сокращались до максимума, принимая форму шариков. Добавление малых концентраций ацетилхолина (10^{-5} моль) вызывало сокращение клеток, причем чаще с одного конца. Эти клеточные реакции ингибируются в отсутствие Ca^{2+} , что согласуется с данными Фэя и Делиза [3].

Таким образом, интактные активные изолированные гладкомышечные клетки с наибольшим успехом можно получить, применяя трипсин и коллагеназу в растворе с минимальным содержанием Ca^{2+} . Описанные методики выделения изолированных клеток характеризуются отсутствием сильных механических воздействий на клетки. Полученные клетки сохраняют основные морфологические признаки клетки ткани гладких мышц в нормальном физиологическом растворе, нормальное функциональное состояние и пригодны для физиологических исследований.

Список литературы

1. Bagby R. M., Young R. S., Fisher B. A., McKinnon K. Contraction of single smooth muscle cells from *Bufo marinus* stomach. — Nature, 234, 1971, N 5328, p. 251—252.
2. Fay F. S., Cooke P. H., Canaday P. G. Contractile properties of isolated smooth muscle cells. — In: Physiology of smooth muscle, New York: Raven Press, 1976, p. 249—264.
3. Fay F. S., Delise C. M. Contraction of smooth muscle isolated cells — structural changes. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, N 3, p. 641—645.
4. Small J. V. Contractive units in vertebrate smooth muscle cells. — Nature, 1974, 249, N 5455, p. 324—327.
5. Small J. V., Squire J. M. Structural basis of contraction in vertebrate smooth muscle. — J. Mol. Biol., 1972, 67, N 64, p. 117—149.
6. Vahouny G. C., Wei R., Starkweather R., Davis C. A method for obtaining isolated cells from cardiac muscle. — Science, 1970, 168, N 3940, p. 1616.

Киевский университет

Поступила в редакцию
01.06.81