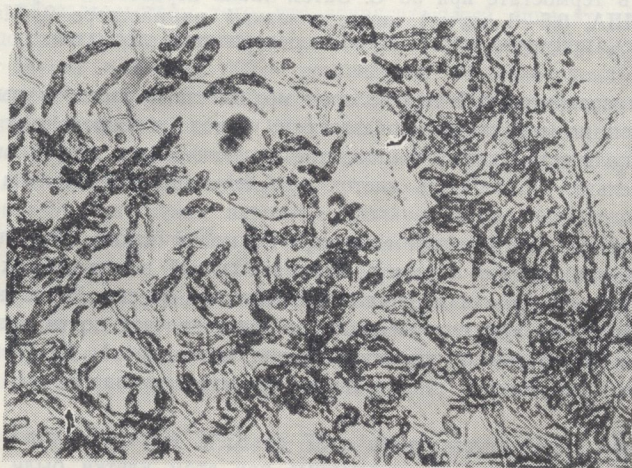


УДК 577.3.08

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 Na_2HPO_4 , 0,4 KH_2PO_4 , 4,0 NaHCO_3 , 5,5 глюкоза, ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} отсутствуют; 2) 130 NaCl, 5 KCl, 4,0 NaHCO_3 , 5,5 глюкоза, 4,0 CaCl_2 .

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

А. 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)

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 (А или Б) 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 суспендированным клеткам добавляли 1 % трипановый синий в растворе 1. Отсутствие окрашивания у 90 % клеток показывало, что практически все клетки хорошо переносят 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*, 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. Contractile 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