

ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ *HELIX POMATIA* И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ КРЫС ЛИННИИ PC-12

В. Л. АНРАПЕТЯН

Изолированные препараты при увеличении тоничности окружающей среды. Было показано, что после действия гиперосмотического шока у нейронов виноградной улитки *Helix pomatia* и культивируемых клеток PC-12 наблюдается частичное восстановление исходного объема.

Изолированные препараты при увеличении тоничности окружающей среды. Было показано, что после действия гиперосмотического шока у нейронов виноградной улитки *Helix pomatia* и культивируемых клеток PC-12 наблюдается частичное восстановление исходного объема.

The volume changes of neurons of *Helix pomatia* and cultured rat pheochromocytoma cells of line PC-12 was studied. It was shown, that after the hyperosmotic stress in both types of cells there was a partial recovery of initial volume.

Осмотичность — клетки — регуляторное изменение объема

В различных типах клеток выявлены различные регуляторные механизмы, восстанавливающие исходный объем клеток после осмотического шока. Когда клетки внезапно подвергаются действию гипер- или гипосмотического шока, то они сначала изменяют свой исходный объем в соответствии с изменением осмотического давления, а затем в течение нескольких минут полностью или частично восстанавливают свой первоначальный объем. Восстановление исходного объема после гиперосмотического шока в литературе принято называть регуляторным увеличением объема (РУвО), а восстановление объема после гипосмотического шока — регуляторным уменьшением объема (РУмО).

В настоящее время явление РУвО обнаружено в красных клетках птиц [8], животных [7, 10], человека [9], в коже лягушки [11], в опухолевых клетках Эрлиха [2] и в лимфоцитах [3]. Однако, по неизвестной до сих пор причине не во всех клетках выявляются объем-регулирующие механизмы после осмотического шока. Например, в опухолевых асцитных клетках Эрлиха лягушки, прямо подвергнутых гиперосмотическому шоку, не наблюдалось РУвО [4].

Изолированные гепатоциты после гипосмотического шока восстанавливали свой исходный объем в течение 15 мин. Однако, после гиперосмотического шока они не были в состоянии достичь этого [1].

Ранее в экспериментах на нейронах центральной нервной системы виноградной улитки мы не наблюдали объемовосстанавливающие

Сокращения: РУвО — регуляторное увеличение объема, РУмО — регуляторное уменьшение объема

механизмы ни после набухания нейрона в гипотонической среде, ни после сморщивания его в гипертонической среде. Поэтому цель настоящей работы состояла в исследовании изменения объема нейронах виноградно-улитки *Helix pomatia* и культивированных клеток феохромоцитомы крысы линии PC-12 в различных экспериментальных условиях и в выявлении объемрегулирующих механизмов по более совершенной и чувствительной методике.

Материал и методика. Опыты проводились на нейронах центральной нервной системы виноградно-улитки *Helix pomatia* и на культивированных клетках феохромоцитомы крысы линии PC-12.

Нейроны улитки изолировали по следующей методике: предварительно удаленные ганглии обрабатывали 0,1–0,2%-ным раствором проназы на физиологическом растворе 1–1,5 ч, при 30–32°C. Затем их промывали холодным раствором Рингера (10–15°C) и оставляли в нем 2–6 ч для восстановления. После этого с помощью электролитически заточенных и KNO_3 , кобальтовых пгп проливали изоляцию нейронов. В тех случаях, когда использовали полностью изолированные нейроны, а группу нейронов (15–20 нейронов в одной группе), изоляцию осуществляли только с помощью пгп без предварительной обработки в растворе проназы. Контрольный изотонический раствор Рингера имел следующий состав (в мМ): $NaCl$ —80, KCl —4, $CaCl_2$ —7, $MgCl_2$ —13, $трис-HCl$ (pH—7,8)—10, глюкоза—10.

Клетки PC-12 выращивали в чашке Петри в специальной среде при 37°C. В течение 30 мин их инкубировали в изотоническом растворе следующего состава (в мМ): $NaCl$ —132, KCl —5, $CaCl_2$ —2, $MgCl_2$ —2, $Нес$ —12, глюкоза—10. Гипертонические растворы готовили добавлением в контрольный изотонический раствор 132,5 или 265 мМ сахарозы.

Блок-схема установки для фоторегистрации изменения объема клеток показана на рис. 1. Были использованы следующие приборы: оптический микроскоп фирмы Nikon (Япония), типа Optiphot-Pol и фирмы Zeiss (Германия) типа Axiovert-35, видеокамеры фирмы NEC типа TI-23A, TI-23P, CCD в комплексе с высокоскоростным процессором изображения (image processor) типа PIP-4060. Весь ход эксперимента записывали на магнитофон, а фотомикро-снимали прямо с экрана телевизора. Для измерения объема клеток PC-12 их насаживали на поверхность тонкой стеклянной пленки размером 15×20 мм в соответствующем растворе, а затем эту пленку в перевернутом положении прикрепляли к поверхности предметного стекла с помощью вазелина таким образом, чтобы внизу под тонкой пленкой стекла образовалось пространство для прохождения раствора. Для измерения нейронов *Helix pomatia* под тонкой пленкой стекла помещали группу клеток, собранную из ганглия. Вазелин использовали также для герметизации камер: одна для тока раствора, другая — истока.

Результаты и обсуждение. В ранних наших экспериментах на нейронах улитки изменение объема клетки в растворах с различными осмотическими давлениями, не сопровождалось последующим восстановлением их исходного объема. Исходя из этих данных, мы предполагали, что восстанавливающие механизмы в нейронах улитки либо отсутствуют, либо функционируют так медленно, что не проявляются в тех интервалах времени, в которых проводится эксперимент (несколько десятков минут), либо они так незначительны, что мы не улавливаем их.

Исследования изменения объема нейронов по описанной выше методике показали, что в нейронах улитки, хотя и незначительный, но существует механизм регуляторного увеличения объема нейрона, частично восстанавливающего объем нейрона после первоначального уменьшения в гипертонических растворах. На рис. 2 (здесь и далее

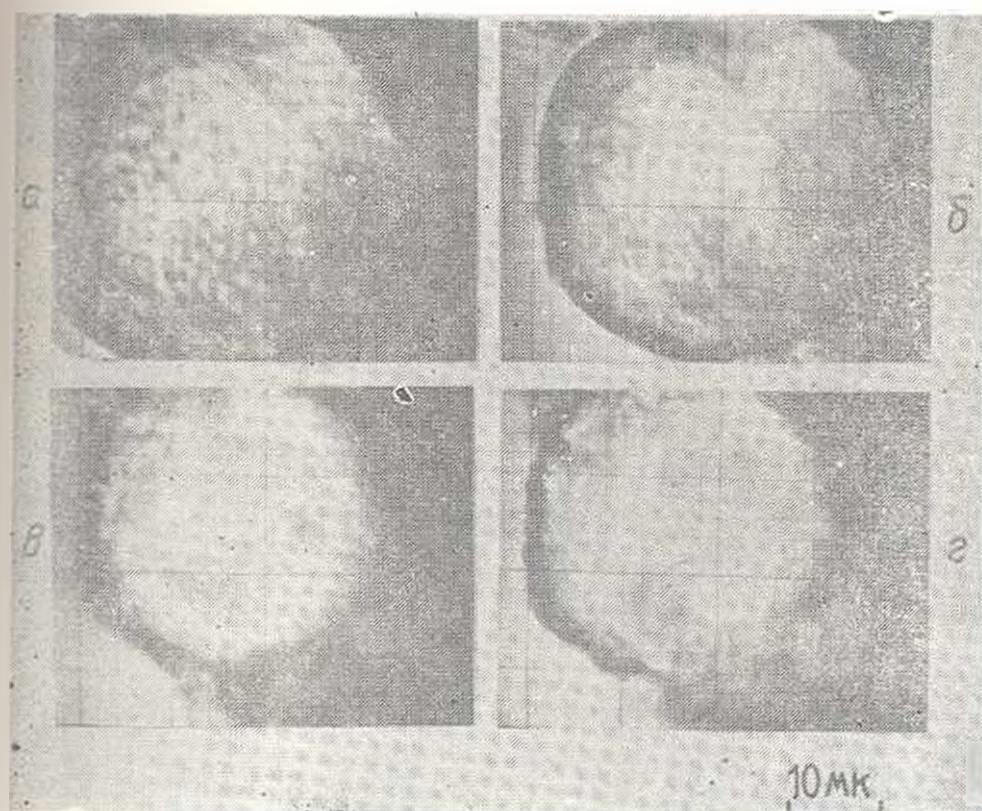


Рис. 2. Наличие механизма регуляторного увеличения объема нейрона в гипертоническом растворе: а—фотоснимок нейрона через 30 мин пребывания его в бескальцевом растворе; б—через 10 мин после переноса в нормальный кальцийсодержащий раствор; в—через 1,5 мин после добавления 265 мМ сахарозы; г—через 5 мин после добавления сахарозы

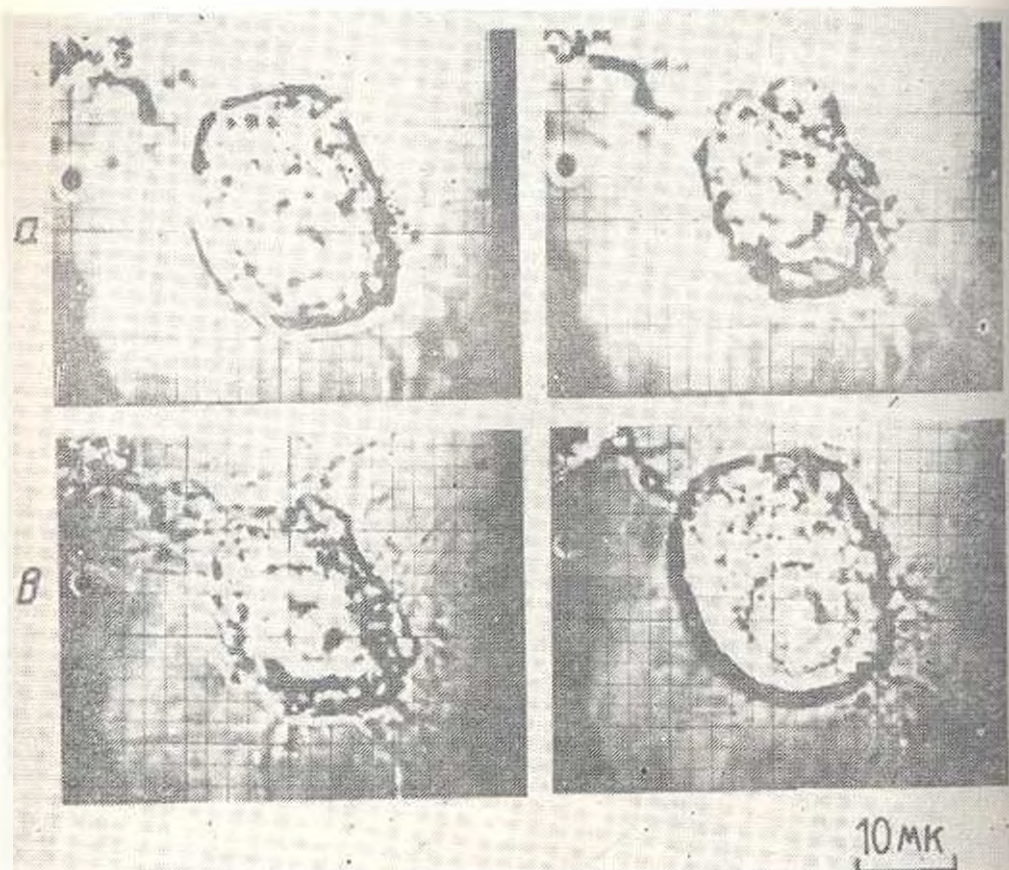


Рис. 3. Наличие механизма регуляторного увеличения объема клетки РС-12 в гипертоническом растворе а—фотоснимок клетки в нормальном растворе Рингера; б—через 1,5 мин после добавления 265 мМ сахарозы; в—через 5 мин после добавления сахарозы; г—через 10 мин пребывания в нормальном растворе.

см., вклеивая 1, 11), показан результат одного из таких экспериментов. Исходно (рис. 2 А) нейрон находится в бескальциевом растворе в набухшем состоянии. Его перенос в нормальный раствор Рингера вызывал уменьшение объема на 27% (рис. 2 Б), обусловленное активацией электрогенного натриевого насоса. При добавлении 265 мМ сахарозы, что соответствует увеличению осмотического давления среды в 2 раза,

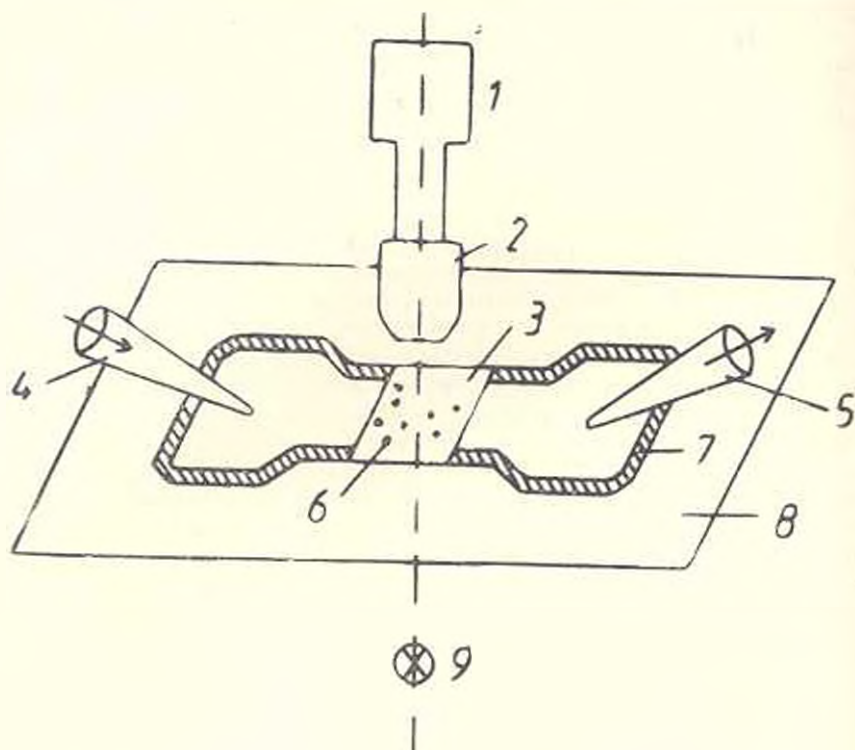


Рис. 1. Блок-схема установки для фоторегистрации изменения объема клеток. 1. Видеокамера; 2. объектив; 3. тонкая стеклянная пленка размером 15×20 мм, на которой фиксируются клетки; 4. трубка для подачи раствора; 5. трубка для слива раствора; 6. клетки; 7. пазелловый слой, образующий экспериментальную камеру и поддерживающий стеклянную пленку (3); 8. предметное стекло; 9. источник света.

объем нейрона начинал быстро уменьшаться и через 1,5 мин достигал 57% своей исходной величины в нормальном растворе Рингера (рис. 2 В). Затем, несмотря на то, что нейрон продолжал находиться в гипертоническом растворе, начинался процесс его набухания. Через 5 мин объем нейрона достиг 72% своей исходной величины в нормальном растворе Рингера (рис. 2 Г). Это свидетельствует о существовании механизма регуляторного увеличения объема нейрона.

Механизм регуляторного увеличения объема в гипертонических растворах наблюдался также в клетках РС-12 (рис. 3). Как видно, перенос клетки из нормального раствора (а) в раствор с повышенным осмотическим давлением (б) вызывал уменьшение объема клетки, который через 1,5 мин достиг 65% своей исходной величины.

Дальнейшее пребывание клетки в том же растворе вызывало частичное восстановление исходного объема. Через 5 мин пребывания клетки в том же растворе вызывало частичное восстановление исходного объема. Через 5 мин пребывания клетки в гипертоническом растворе ее объем увеличивался и достигал 80% своей исходной величины в нормальном растворе (рис. 3B). Перенос клетки в нормальный раствор полностью восстанавливал ее объем, который в некоторых случаях был даже больше, чем в исходном состоянии (рис. 3Г)*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bakker Grunwald I. *Biochim Biophys Acta*, 731, 239—242, 1983.
2. Gack P., Pietrzyk C., Burchhardt B. C., Pfeiffer B. Heinz E. *Biochim Biophys Acta*, 600, 432—447, 1980.
3. Grinstein S., Rothstein A., Sarkadi B., Gelfand E. W. *Am J Physiol*, 246, 204—215, 1984.
4. Hampling H. G. *J Gen Physiol*, 44, 365—379, 1960.
5. Hendli K. B., Hoffman E. K. *J. Cel. Physiol*, 84, 115—125, 1974.
6. Hoffmann E. K., Sjöholm C., Simonsen L. O. *J Membr Biol*, 76, 269—280, 1983.
7. Jennings M. L., Douglas S. M., McAndrew P. E. *Am J Physiol*, 251, 32, 1986.
8. Krugnow F. M. *Ann. Rev Physiol*, 47, 493—505, 1985.
9. O'Neill W. Ch., Mikkelsen R. B. *Biochim Biophys Acta*, 896, 186—202, 1987.
10. Parker J. C. *Am J Physiol*, 244, 324—330, 1983.
11. Ussing H. H. *Renal Physiol*, 9, 38—46, 1986.

* Приношу благодарность за предоставленную возможность выполнения работы профессору Теракава С. (Нац ин-т физиологии, г. Окадзэки, Япония).