УДК 612.73

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛАДКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН СУДИН У ТКАНИННІЙ КУЛЬТУРІ

М. І. Гуревич, І. Р. Євдокимов, Л. І. Барченко, О. Д. Майська

Відділ фізіології кровообігу та відділ експериментальної терапії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Вивчення периферичних механізмів підтримання та регуляції судинного тонусу є однією з найважливіших проблем фізіології кровообігу. З'ясування ролі міогенної активності гладких м'язів у підтриманні тонусу судин являє собою, мабуть, основний аспект цієї проблеми. За останні роки досягнуто значних успіхів у вивченні функціонування гладких м'язів стінки судини.

Результати досліджень електричних та скоротливих реакцій судин переконливо вказують на істотні відмінності їх функціональної характеристики [1]. Ці відмінності можуть залежати від ряду причин: відмінності у функціональній організації, енергетичному обміні, нейрогенних та гуморальних впливах на гладком'язові елементи тощо. Висловлюються припущення про можливі відмінності у властивостях гладком'язових клітин різних судин.

Ці питання досі мало досліджені в експерименті. Особливо це стосується біофізичних характеристик клітин гладких м'язів судин.

У зв'язку з проведеними нами раніше дослідженнями по вивченню електричних параметрів гладком'язових клітин у смужках судин [2], було продовжено вивчення цих характеристик і деяких морфологічних особливостей аналогічних гладком'язових клітин судин у тканинній культурі. Нам здається, що за допомогою даних, одержаних на тканинній культурі, можна шляхом зіставлення уточнити форму, розміри та електричні характеристики клітин гладких м'язів судин різного типу та більш впевнено відповісти на питання про наявність чи відсутність відмінностей у цих клітинах.

Вивчення фізіології та морфології клітин методом тканинних культур відкриває великі можливості перед дослідником. Як показано в експериментах на прикладі клітин серцевого м'яза, гладком'язових клітинах, нейронах різних відділів центральної нервової системи та ін., на усіх фазах росту в культурі вони зберігають відповідність клітинам аналогічної тканини *in vivo* [5, 9, 10, 12].

Дослідження, проведені на культурах клітин серцевого м'яза курчати та аорти морської свинки, дозволили виявити, що в процесі росту окремі клітини організуються в групи. Якщо на ранніх стадіях розвитку культури кожна клітина серцевого м'яза скорочується за своїм власним ритмом, то при об'єднанні кожна група починає скорочуватися з певною частотою, що задається водієм ритму, роль якого приймає на себе одна або кілька клітин цієї групи [7, 10, 11]. Закономірність агрегації клітин у групи на різних стадіях розвитку культури дозволила

деяким дослідникам вважати
вість одержати модель, зокр
генезу [8, 9].

Клітини, вирощені у тка
об'єкт для електрофізіологічн
жати окремі, ізольовані від т
кільки у культурі можна ро
стиві тканинам *in vivo*, то з
вивчення. Наприклад, було
гліальних клітин мозочка ко

При досить великому збіл
мікроскопі) вдалося здійснит
ня соми нейронів та дендритів

У літературі є відомості
клітин та клітин серцевого м
тенціал вимірювали в куль
мозочка, клітин серцевого м
про дослідження цих парам
тканинній культурі нема.

Мет

Для культивування було взят
вени кролика. Експлантати судин к
редовищі, що складалося з розчину
та ембріонального екстракту. Згус
або покривному склі, що полегшув
культивували при 37° С. Експериме
тим днями культивування. Спостер
дилося під фазоконтрастним мікро
клітин здійснювалося за допомого
нах культури і на фотографіях при

Електричні параметри гладко
спеціальних камерах у двох варіан
баційному середовищі. За нашими
незначне підсихання інкубаційного
ліду (близько 1,5—2,0 *год*) істотно
Друга частина вимірювань провод
95% O_2 +5% CO_2. Температура ін
валася у межах 35—37° С. Істотно
падках не було виявлено. Проте
коливання клітин, що затруднювало

Камеру з культурою клітин
містився в екранованій камері. Ми
поляризаційний мікроскоп (МРІ-5
ренції, особливо зручний для точн
Пояснюється це тим, що дифере
більшою пластичністю, рельєфніст
збавлене побічних облямувань ти
фазового контрасту. Це зображен
вигляд таких об'єктів як нефарбо
зовим контрастом.

Скляний мікроелектрод (за
30 Мом) закріплювали у спеціал
горизонтальної площини. Мікрома
міщувати мікроелектроди у трьо
досягалося за допомогою дистанц
в клітину відбувалося під мікрос

Вимірювання електричних п
яка давала можливість використ
зації клітинної мембрани струмом
ни поляризуючого струму [2].

...УК УКРАЇНСЬКОЇ РСР, 1974, т. XX, № 2

УДК 612.73

...А ХАРАКТЕРИСТИКА ...КЛІТИН СУДИН ...КУЛЬТУРІ

...имов, Л. І. Барченко,
...ська

...риментальної терапії Інституту фізіології ... АН УРСР, Київ

...мів підтримання та регуляції су-
...іших проблем фізіології кровообі-
...ості гладких м'язів у підтриманні
...новний аспект цієї проблеми. За
... у вивченні функціонування глад-

...их та скоротливих реакцій судин
...нності їх функціональної характе-
...ежати від ряду причин: відмінно-
...гетичному обміні, нейрогенних та
...і елементи тощо. Висловлюються
... у властивостях гладком'язових

...в експерименті. Особливо це сто-
...тин гладких м'язів судин.
...ніше дослідженнями по вивченню
...х клітин у смужках судин [2], бу-
...истик і деяких морфологічних осо-
... клітин судин у тканинній куль-
... даних, одержаних на тканинній
...точнити форму, розміри та елек-
...'язів судин різного типу та більш
...аявність чи відсутність відмінно-

... клітин методом тканинних куль-
... дослідником. Як показано в ек-
...ого м'яза, гладком'язових кліти-
...ьної нервової системи та ін., на
...ерігають відповідність клітинам
...].
...рах клітин серцевого м'яза кур-
...или виявити, що в процесі росту
...Якщо на ранніх стадіях розвитку
...яза скорочується за своїм влас-
... група починає скорочуватися з
... ритму, роль якого приймає на
... [7, 10, 11]. Закономірність агре-
...х розвитку культури дозволила

деяким дослідникам вважати, що метод культури тканин дає можливість одержати модель, зокрема, для вивчення різних аспектів атерогенезу [8, 9].

Клітини, вирощені у тканинній культурі, являють собою унікальний об'єкт для електрофізіологічних досліджень. Таким шляхом можна одержати окремі, ізольовані від тканини, напевно неушкоджені клітини. Оскільки у культурі можна роздільно спостерігати клітинні форми, властиві тканинам *in vivo*, то з цього витікає можливість вибіркового їх вивчення. Наприклад, було проведено роздільне вивчення нейронів і гліальних клітин мозочка кошенят, кроликів та щурів.

При досить великому збільшенні (близько ×600 у фазоконтрастному мікроскопі) вдалося здійснити роздільні електрофізіологічні дослідження соми нейронів та дендритів [4, 6].

У літературі є відомості про вимірювання опору і ємності гліальних клітин та клітин серцевого м'яза у тканинній культурі. Мембранний потенціал вимірювали в культурі тканини нейронів і гліальних клітин мозочка, клітин серцевого м'яза та ін. [3, 4, 6, 10]. Проте, відомостей про дослідження цих параметрів у гладком'язових клітинах судин у тканинній культурі нема.

Методика досліджень

Для культивування було взято ділянки інтими і медії легеневої артерії та ворітної вени кролика. Експлантати судин культивували у флаконах Карреля, на поживному середовищі, що складалося з розчину Тіроде, плазми крові гуся, сироватки крові кролика та ембріонального екстракту. Згусток плазми розміщувався на підкладці з целофану або покривному склі, що полегшувало дальші маніпуляції з експлантатом. Експлантати культивували при 37° С. Експерименти проводили на клітинах між четвертим та дев'ятим днями культивування. Спостереження за клітинами та їх фотографування проводилося під фазоконтрастним мікроскопом при збільшенні ×400. Вимірювання величини клітин здійснювалося за допомогою окуляр-мікрометра безпосередньо на живих клітинах культури і на фотографіях при строго визначених збільшеннях.

Електричні параметри гладком'язових клітин тканинної культури вимірювали у спеціальних камерах у двох варіантах. У першому всі вимірювання проводилися в інкубаційному середовищі. За нашими спостереженнями і даними інших дослідників [7], незначне підсихання інкубаційного середовища у процесі відносно короткочасного досліду (близько 1,5—2,0 *год*) істотно не позначалося на величині електричних параметрів. Друга частина вимірювань проводилася у проточному розчині Кребса, що насичувався 95% O_2 +5% CO_2. Температура інкубаційного середовища і розчину Кребса підтримувалася у межах 35—37° С. Істотної різниці у величині основних показників в обох випадках не було виявлено. Проте у проточній камері течія рідини викликала невеликі коливання клітин, що затруднювало введення мікроелектрода.

Камеру з культурою клітин розміщали на предметному столику мікроскопа, який містився в екранованій камері. Ми застосували в наших дослідженнях інтерференційно-поляризаційний мікроскоп (МРІ-5), використовуючи метод диференціальної інтерференції, особливо зручний для точного введення мікроелектрода в обране місце клітини. Пояснюється це тим, що диференціальне інтерференційне зображення відрізняється більшою пластичністю, рельєфністю та вірністю відтворення, крім того, воно ще й позбавлене побічних облямувань типу «гало» та інших небажаних ефектів, типових для фазового контрасту. Це зображення дає більше інформації про форму, структуру та вигляд таких об'єктів як нефарбовані клітини у тканинній культурі у порівнянні з фазовим контрастом.

Скляний мікроелектрод (заповнений 3М розчином KCl, опором близько 20—30 Мом) закріплювали у спеціальному тримачі мікроманіпулятора під кутом 15° до горизонтальної площини. Мікроманіпулятор надавав можливість точно і плавно переміщувати мікроелектроди у трьох взаємноперпендикулярних площинах. Переміщення досягалося за допомогою дистанційних гідравлічних передач. Введення мікроелектрода в клітину відбувалося під мікроскопом при збільшенні ×400 — ×600 (рис. 1).

Вимірювання електричних параметрів провадили за допомогою мостової схеми, яка давала можливість використовувати один мікроелектрод для одночасної поляризації клітинної мембрани струмом та реєстрації трансмембранного потенціалу і величини поляризуючого струму [2].

Результати досліджень та їх обговорення

Культура росла з посадженого експлантата на протязі кількох днів. Ріст клітин культури ворітної вени кролика був більш інтенсивним, ніж легеневої артерії. Зона росту у ворітної вени була більша за розміром. У перші дні росту в культурі можна було спостерігати клітини різноманітної форми, проте, переважна більшість мала характерну для гладком'язових клітин веретеноподібну форму з великим ядром посеред клітини (рис. 2 і 3). В ряді випадків клітини іноді мали довгі та вузькі цитоплазматичні нитки, якими вони з'єднувалися між собою.

Рис. 1. Кінець скляного мікроелектрода знаходиться всередині гладком'язової клітини легеневої артерії кролика, вирощеної у культурі тканини.

Вимірювання показали, що гладком'язові клітини ворітної вени кролика у тканинній культурі мають довжину 119±2 *мк* та діаметр 12±0,2 *мк* (за даними вимірювань 151 клітини). Гладком'язові клітини легеневої артерії кролика у культурі тканини незначно відрізнялися за формою та розмірами. Довжина цих клітин дорівнювала 126±2 *мк*, а діаметр 13±0,25 *мк* (за даними вимірювань 148 клітин). Площа поверхні клітин, розрахована за моделлю подвійного конусу відповідної довжини та діаметра основи [2], дорівнює $26{,}9 \cdot 10^{-6}$ *см*^{2} для клітини ворітної вени та $30{,}7 \cdot 10^{-6}$ *см*^{2} для гладком'язових клітин легеневої артерії кролика у культурі тканини.

Було проведено відносно невелике число вимірювань мембранного потенціалу і вхідного опору клітини у культурі тканини. За нашими даними, мембранний потенціал гладком'язових клітин експлантатів ворітної вени становить 34±1 *мв* ($n=20$), а вхідний опір — 72±10 *Мом* ($n=21$). Мембранний потенціал гладком'язових клітин легеневої артерії дорівнює 35±1 *мв* ($n=15$) ,а вихідний опір клітин — 67±6 *Мом* ($n=11$). Розрахований за одержаними даними питомий опір мембрани гладком'язових клітин ворітної вени у культурі тканини дорівнює 1920 *ом*·*см*^{2}, а гладком'язових клітин легеневої артерії — 2060 *ом* · *см*^{2} (див. таблицю).

Величини вхідного опору гладком'язових клітин легеневої артерії та ворітної вени кролика у культурі тканини наближаються до одержаних нами у смужці легеневої артерії [2]. Питомий опір мембрани гладком'язових клітин у культурі тканини виявився більш високим, ніж у смужці судини. Це пояснюється тим, що клітини у культурі тканини, за

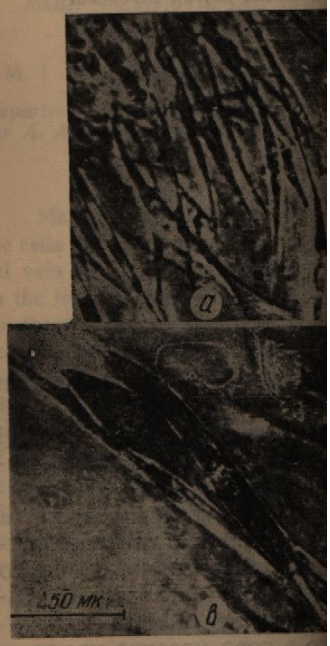

Рис. 2. Культура тканини.
Ліворуч вгорі «зона росту» культури.
м'язових клітин. Праворуч внизу — окр

Рис. 3. Культура ткан
Вгорі ліворуч — «зона рост

та їх обговорення

плантата на протязі кількох днів. лика був більш інтенсивним, ніж ї вени була більша за розміром. ло спостерігати клітини різноматість мала характерну для гладкоом'язових клітин веретеноподібну форму з великим ядром посеред клітини (рис. 2 і 3). В ряді випадків клітини іноді мали довгі та вузькі цитоплазматичні нитки, якими вони з'єднувалися між собою.

Вимірювання показали, що гладком'язові клітини ворітної вени кролика у тканинній культурі мають довжину 119±2 *мк* та діаметр 12±0,2 *мк* (за даними вимірювань 151 клітини). Гладком'язові клітини легеневої артерії кролика у культурі тканини незначно відрізнялися за формою та розмірами. Довжина цих клітин дорівнювала 126±2 *мк*, а діаметр 13±0,25 *мк* (за даними вимірювань 148 клітин). Площа поверхні клітин, розрахована за моделлю подвійного конусу відповідної довжини та діаметра осно-

Рис. 1. Кінець скляного мікроелектрода знаходиться всередині гладком'язової клітини легеневої артерії кролика, вирощеної у культурі тканини.

ни ворітної вени та $30{,}7 \cdot 10^{-6}$ *см*^{2} артерії кролика у культурі

число вимірювань мембранного культурі тканини. За нашими даових клітин експлантатів воріт-вхідний опір — 72±10 *Мом* (n= вих клітин легеневої артерії дотір клітин — 67±6 *Мом* (n=11). питомий опір мембрани гладкої тканини дорівнює 1920 *ом*·*см*^{2}, ерії — 2060 *ом* · *см*^{2} (див. таб-

ових клітин легеневої артерії та ни наближаються до одержаних томий опір мембрани гладком'яся більш високим, ніж у смужклітини у культурі тканини, за

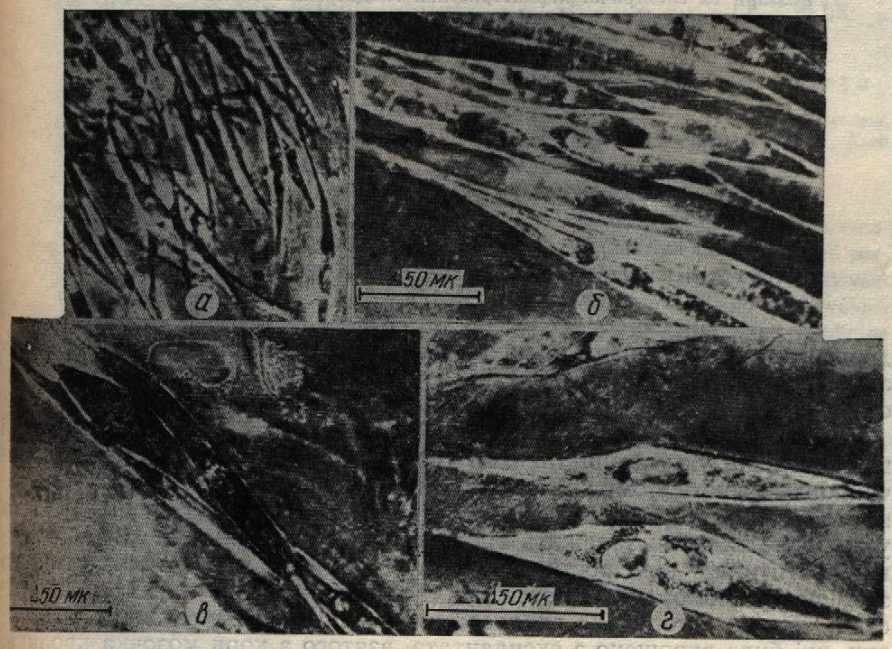

Рис. 2. Культура тканини. Гладком'язові клітини ворітної вени кролика.
Ліворуч вгорі «зона росту» культури. Ліворуч внизу і праворуч угорі — об'єднання у групи гладком'язових клітин. Праворуч внизу — окремі гладком'язові клітини у культурі *б* та *в* збільшені вдвоє.

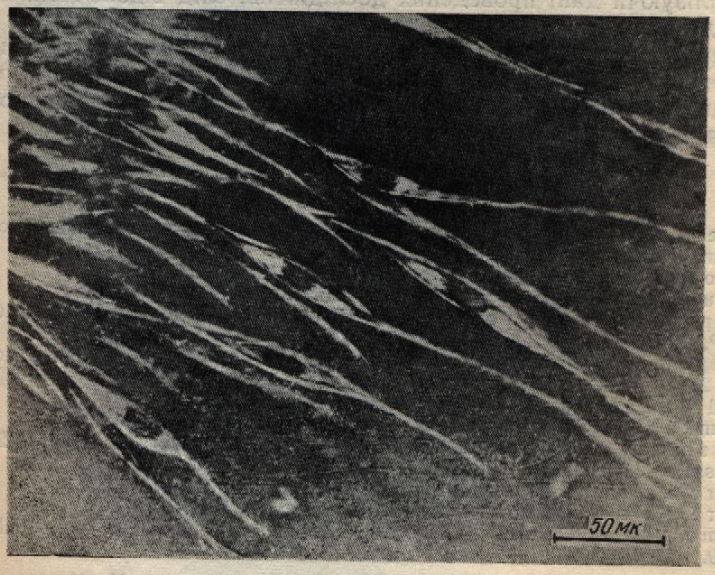

Рис. 3. Культура тканини. Гладком'язові клітини легеневої артерії кролика.
Вгорі ліворуч — «зона росту» культури. Внизу праворуч — окремі гладком'язові клітини.

Розміри та електричні характеристики гладком'язових клітин легеневої артерії та ворітної вени кролика у культурі тканини

Досліджувані параметри	Легенева артерія	Ворітна вена
МП (мембранний потенціал) *мв*	35±1	34±1
R_0 (вхідний опір клітини) *Мом*	67±6	72±10
$R_м$ (питомий опір мембрани) *ом·см²*	2060	1920
d (діаметр клітини) *мк*	13,0±0,3	12,0±0,2
l (довжина клітини) *мк*	126±2	119±2
s (поверхня клітинної мембрани) *см²*	$30,7 \cdot 10^{-6}$	$26,9 \cdot 10^{-6}$

даними наших вимірювань, мають більші розміри, ніж ті, що приймалися нами, за даними літератури, у розрахунках для клітин смужки судини.

Мембранний потенціал гладком'язових клітин легеневої артерії і ворітної вени у культурі тканини трохи нижчий, ніж той, що його звичайно вимірюють у смужках аналогічної судини. Смірнова та ін. [4] встановили, що мембранний потенціал нейронів спинного ганглію кролика у культурі тканини залежить від дня культивування та місця розташування клітини у зоні росту культури. У клітин, розташованих на краю зони росту, мембранний потенціал був нижчим, ніж у центральній частині. Проте, авторам не вдалося виявити подібної залежності для клітин, які було вирощено з експлантата, взятого з кори мозочка кролика. Ми не знайшли будь-яких істотних відмінностей у величині мембранного потенціалу клітин залежно від їх розташування та від віку культури. Поки що важко пояснити причини більш низького мембранного потенціалу гладком'язових клітин судин у тканинній культурі.

Аналізуючи дані проведених досліджень, слід відзначити, що нами не виявлено чітких відмінностей електричних параметрів клітин легеневої артерії та ворітної вени кролика, вирощених у культурі тканини. Слід припустити, що істотні відмінності в міогенній активності та реакціях цих судин пов'язані, головним чином, з особливостями функціональної організації гладких м'язів різних судин.

Література

1. Гуревич М. И., Берштейн С. А.— Функциональные особенности сосудистых гладких мышц и тонус сосудов, К., 1972.
2. Євдокимов І. Р.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1971, 17, 4, 487.
3. Кокина Н. Н., Жуковская Н. М.— Цитология, 1968, 108, 953.
4. Смирнова И. А., Курелла Г. А., Шушская В. Е., Ененко С. О.— ДАН СССР, 1971, 196, 5.
5. Campbell G., Uchara L., Mark G., Bernstock G.— J. Cell Biology, 1971, 49, 1, 21.
6. Hild W., Tasabsi I.— J. Neurophysiol., 1962, 25, 2, 277.
7. Lehmkuhl D., Sperelakis N.— Am. J. Physiol., 1963, 205, 1213.
8. Myasnikov A., Block J., Pavlov V.— J. Atheroscl. Res. ,1969, 6, 224.
9. Ross R.— J. Cell. Biol., 1971, 50, 11, 172.
10. Sperelakis N., Lehmkuhe D.— J. Jen. Physiol., 1964, 47, 5, 895.
11. Sperelakis N., Pappano A.— J. Gen. Physiol., 1969, 53, 97.
12. Jarmolych J., Daoud A., Landou K., Trits A.— Exp. mol., Pathol., 1968, 171, 9.

Надійшла до редакції
2.XII 1972 р.

MORPHOFUNCTIONAL CHAR
OF THE VESSE

M. I. Gurevich, I. R. Evdok

Department of Physiology of Blood
the A. A. Bogomoletz Institute of Ph

Measurement of the value and
cle cells were performed for the cultu
tal vein of the rabbit. It is shown t
in the tissue culture are 119±9 μ lo
for those of the pulmonary artery are
potential of the smooth muscle cells
impedance — 72±10 MΩ the same p
35± 1 mV and 67±6 MΩ respectiv
making a conclusion on the distinct
of the smooth muscles cells in the
the tissue culture. A supposition is
vity and reactions of these vessels a
peculiarities of smooth muscles in diff

и гладком'язових клітин легеневої
лика у культурі тканини

	Легенева артерія	Ворітна вена
	35±1	34±1
	67±6	72±10
	2060	1920
	13,0±0,3	12,0±0,2
	126±2	119±2
	$30{,}7\cdot10^{-6}$	$26{,}9\cdot10^{-6}$

льші розміри, ніж ті, що приймарозрахунках для клітин смужки

язових клітин легеневої артерії і
хи нижчий, ніж той, що його звиної судини. Смірнова та ін. [4] встаейронів спинного ганглію кролика
культивування та місця розташу-
У клітин, розташованих на краю
в нижчим, ніж у центральній чавити подібної залежності для клі-
, взятого з кори мозочка кролика.
дмінностей у величині мембранноозташування та від віку культури.
льш низького мембранного потенканинній культурі.
іджень, слід відзначити, що нами
гричних параметрів клітин легенерощених у культурі тканини. Слід
міогенній активності та реакціях
з особливостями функціональної
.

ура

Функциональные особенности сосудистых

РСР, 1971, 17, 4, 487.
итология, 1968, 108, 953.
ушская В. Е., Ененко С. О.— ДАН

Bernstock G.— J. Cell Biology, 1971,

1962, 25, 2, 277.
Physiol., 1963, 205, 1213.
V.— J. Atheroscl. Res. ,1969, 6, 224.

Physiol., 1964, 47, 5, 895.
Physiol., 1969, 53, 97.
K., Trits A.— Exp. mol., Pathol., 1968,

Надійшла до редакції
2.XII 1972 р.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE VESSELS IN THE TISSUE CULTURE

M. I. Gurevich, I. R. Evdokimov, L. I. Barchenko, O. D. Maiskaya

Department of Physiology of Blood Circulation and Department of Experimental Therapy, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Measurement of the value and determination of electric parameters of smooth muscle cells were performed for the culture of tissue taken from the pulmonary artery and portal vein of the rabbit. It is shown that the smooth muscle cells of the rabbit portal vein in the tissue culture are 119±9 μ long and their diameter is 12±0.2 μ and these values for those of the pulmonary artery are 126±2 μ and 13+0.25 μ respectively. The membrane potential of the smooth muscle cells in the portal vein explantats is 34±1 mV, and input impedance — 72±10 MΩ the same parameters for the the pulmonary vein explantats are 35± 1 mV and 67±6 MΩ respectively. The obtained data do not give any reason for making a conclusion on the distinct differences in the dimentions and electric parameters of the smooth muscles cells in the rabbit pulmonary artery and portal vein, grown in the tissue culture. A supposition is advanced that the differences in the myogenic activity and reactions of these vessels are mainly connected with the functional organization peculiarities of smooth muscles in different vessels.