

ДЕЯКІ МОРФОЛОГІЧНІ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ТРИПСИНІЗОВАНИХ КЛІТИН СЕРДЕЦЬ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРЕНЯТ

М. С. Веселовський

Відділ фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР,
Київ

Дослідження ізольованих серцевих клітин (ІСК) є досить перспективним напрямком у сучасній фізіології серця. Відсутність електричних контактів з іншими клітинами, можливість надійно контролювати склад позаклітинного середовища та здійснювати візуальні спостереження роблять ізольовану серцеву клітину надзвичайно зручним об'єктом для електрофізіологічних і біохімічних досліджень.

Тепер відомі два методи одержання ІСК: клітинна суспензія [2, 8] і культура серцевих клітин [3, 5]. Більшість праць, присвячених вивченню електричної активності і механізмів іонного транспорту ІСК, виконані на культурі серцевих клітин. Крім того на культурі серцевих клітин проведені й морфологічні дослідження для вивчення росту клітин, характеру їх об'єднання в групи і синхронізації скорочень. Проте в культурі диференціювальне дослідження окремих типів серцевих клітин сильно утруднене, оскільки досить швидко, в міру прикріплення до скла і росту культури на його поверхні, клітина істотно змінює свою форму. Тому вибіркове дослідження властивостей різних типів серцевих клітин стає частково можливим тільки шляхом аналізу електричної активності ІСК, яку відводять внутріклітинно мікроелектродами.

Опубліковані нещодавно результати дослідження суспензії ІСК показали, що вони можуть нормально функціонувати і скорочуватися протягом тривалого часу, одразу після дезагрегації сердець, у відносно простих ізотонічних розчинах [2, 8]. Проте недостатньо повний морфологічний опис та відсутність електрофізіологічних даних про властивості клітин у суспензії утруднюють далі дослідження в цьому напрямку.

Ми поставили завдання вивчити суспензію ІСК морфологічно і порівняти одержані результати з відомими гістологічними даними, а також провести попередні дослідження електричної активності скоротливих ІСК з допомогою внутріклітинних відведень.

Методика досліджень

Кожен дослід провадили на трьох новонароджених щуренятах віком 5—10 днів. Серця вмішували в холодний розчин А₂ (NaCl — 140 мМ, KCl — 5,2 мМ, NaHCO₃ — 4,1 мМ, Тріс-буфер — 15 мМ, C₆H₁₂O₆ — 5,5 мМ, пеніцилін і стрептоміцин — по 100 од. і мл розчину, рН=7,3) і розсікали лезом на дві частини для промивання порожнини шлуночків від крові. Потім шматочки серця переносили в бюкс з осклованим магнітом всередині і заливали 5—10 мл свіжовиготовленого 0,04% розчину трипсину. Бюкс вмішували в термостат на електромагнітну мішалку (температура 36°С). Залежність виходу скоротливих клітин від концентрації трипсину і часу експозиції в ньому наведена

на рис. 1. Виходячи з цієї залежності, для одержання максимальної кількості життєздатних клітин режим трипсинізації був обраний таким: інкубація — 30 хв (надклітинну завись, що містить еритроцити і малу кількість клітин видаляли); 1 період — 30 хв, потім в наступні 2—8 періоди клітинну суспензію знімали через кожні 10 хв і ставили на лід на 10 хв. Через 3—4 хв центрифугування (1000 об/хв) надосадову завись видаляли, осад ресуспендували в холодному розчині A_2 і суспензію вміщували в холодильник при температурі 4°C . Для спостереження і мікроелектродних відведень клітин

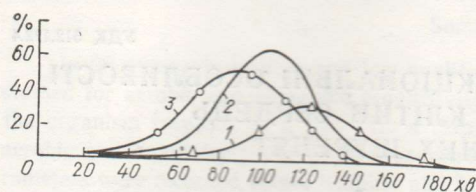


Рис. 1. Залежність виходу скоротливих клітин (в %, до числа живих клітин на полі діаметром 200 мк, усереднені дані) від концентрації трипсину і часу експозиції.

Криві 1—3 відповідають різним концентраціям трипсину (1 — 0,02%, 2 — 0,05%, 3 — 0,07%).

чином КСІ безпосередньо перед дослідом. Введення мікроелектродів в окремі клітини здійснювали під кутом $30-50^\circ$ до горизонтальної площини з допомогою модифікованого мікрomanipулятора ММ-1. Реєстрацію відведень здійснювали на двоканальному чорнилопишучому приладі РПЧ-2.

Результати досліджень

Одержана суспензія клітин неоднорідна за своїм складом (рис. 2, а—г). В основному вона складається з довгастих і овальних клітин.

Сферичні і темні клітини різної форми мають ознаки ураження: відсутність скоротливої активності, порушена мембрана, помутніння протоплазми, вакуолізація. У більшості живих довгастих клітин добре простежуються ядра, міофібрилярний апарат з характерною поперечною покресленістю.

Овальні клітини звичайно мають менший процент (по відношенню до загального об'єму клітини) міофібрил і більше ядро в порівнянні з довгастими. Скоротлива активність клітин цих двох типів неоднакова. Одразу після вміщення клітин у камеру чітко скорочуються як довгасті, так і овальні клітини. Проте через 10—15 хв процент скоротливих клітин зменшується, тоді як для овальних залишається практично таким же. Припинення скорочень довгастих клітин не зумовлено їх загибеллю, оскільки механічне подразнення їх кінчиком мікроелектрода викликає появу нетривалої скоротливої активності. Більш грубе подразнення довгастої клітини електродами приводить до «зморщування» і набування нею овальної форми. Проте жодна з одержаних у такий спосіб «овальних» клітин не скорочувалась і всі вони мали типові ознаки ураження. На вигляд довгасті і овальні клітини дуже схожі на клітини, описані на підставі дослідження гістологічних препаратів передсердя і шлуночків [6]. Тому можна припустити, що форма одержаних клітин мало змінилась у порівнянні з спостережуваною в цільному серцевому м'язі. На підтвердження тому, що дані клітини є м'язовими, можна привести спостереження над клітинами із зруйнованою мембраною. Такі клітини (рис. 2, д, е) з'являються в суспензії при більш тривалій експозиції серцевої тканини в трипсині (20—30 хв у нормі). В цьому випадку типовий міофібрилярний каркас та уражені ядра зберігають свою форму, очевидно, внаслідок того, що трипсин уражує мембра-

ну ще до вивільнення клітини з серцевої тканини, а структурний зв'язок з іншими клітинами не дозволяє міофібрилам стискатися.

Частота скорочень ІСК в даному ізотонічному розчині постійна протягом 1—2 год знаходження в камері (в холодильнику клітини зберігаються в нормальному функціональному стані до 12 год). Скорочення, незважаючи на відсутність протоки і оксигенування середовища, ритмічні і у різних клітин коливаються в межах 30—120 скор/хв при кім-

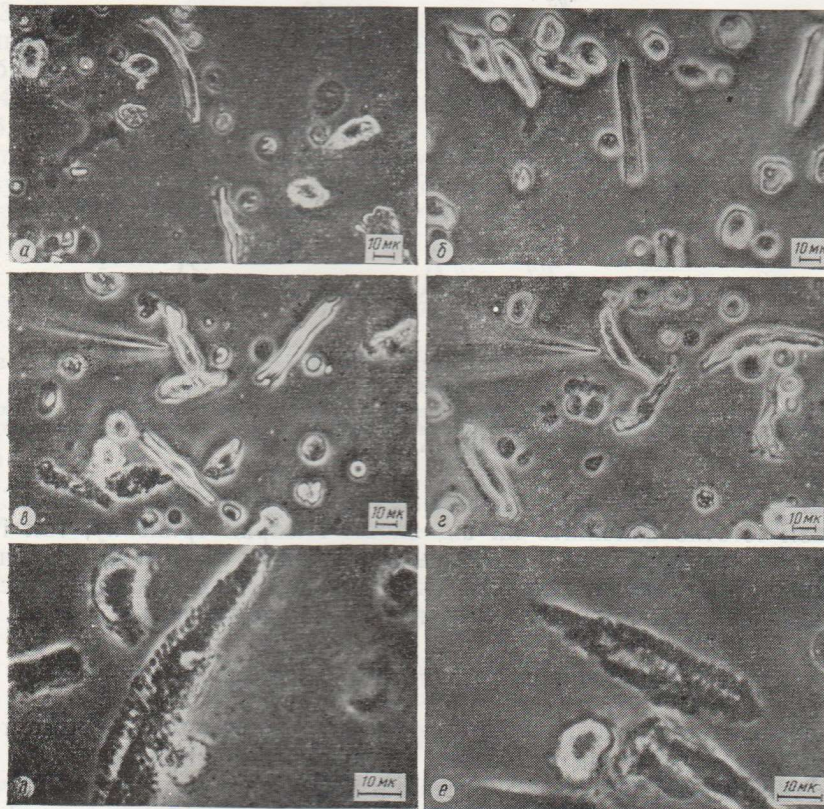


Рис. 2. Ізольовані серцеві клітини в суспензії.

а, б—довгасті і овальні клітини; в, г—довгасті скоротливі, клітини (з мікроелектродом); д, е—клітини з ураженою мембраною, чітко видний міофібрилярний каркас. Фазоконтрастний мікроскоп, жовто-зелений фільтр.

натній температурі. Підвищення температури від 22 до 30° С приводить до збільшення частоти скорочень до 200—300 скор/хв, появи часткової аритмії та припинення їх.

Величина потенціалу спокою ІСК в суспензії коливається в межах 15—30 мВ, при досить тонкому мікроелектроді вона постійна. Опори мембрани ІСК R_m , визначені з допомогою моста постійного струму, становлять 30—70 Мом залежно від розмірів клітин.

Для всіх скоротливих ІСК характерні спонтанні ритмічні коливання мембранного потенціалу (МП), синхронні скороченням. Ці коливання МП можна поділити на дві групи: коливання з повільною деполяризацією (рис. 3, а, б) і типові потенціали дії (ПД, див. рис. 3, д, в, г, е). Поляризація мембрани ізольованої клітини гіперполяризуючим струмом викликає зміну її електричної активності. В клітинах першої групи на

вершинах повільної деполяризації розвивається ПД (рис. 3, а, б). В клітинах другої групи одні клітини реагують на гіперполяризуючий струм лише зміною частоти генерації ПД (рис. 3, д) без помітних змін амплітуди, в інших же (рис. 3, е) змінюється частота і збільшується амплітуда.

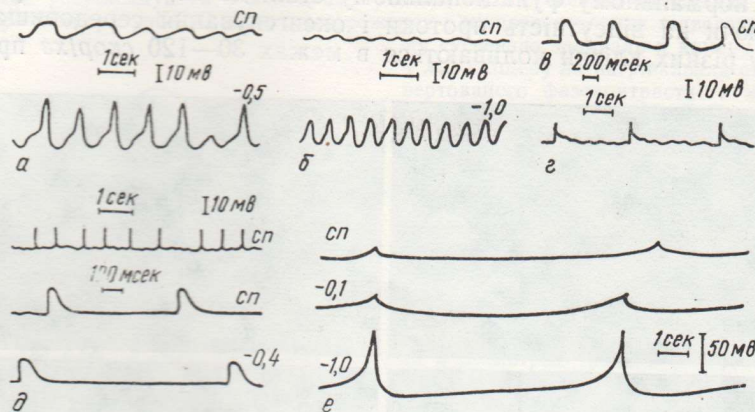


Рис. 3. Внутріклітинні відведення мембранних потенціалів скоротливих ізолюваних серцевих клітин.

а, б — пейсмерні потенціали, при гіперполяризації виникають потенціали дії (цифри — величина струму в наноамперах); в, г, д, е — спонтанні потенціали (СП) дії (д, е — вплив гіперполяризуючого струму).

да ПД. Слід відзначити, що величина потенціалу спокою у всіх ІСК в суспензії істотно залежить як від якості і марки трипсину, так і від режиму трипсинізації, зменшуючись при уражуючих впливах. При недостатньо стерильному виготовленні суспензії також спостерігається швидке зменшення потенціалу спокою у більшості клітин.

Обговорення результатів досліджень

Наведені результати показують, що при підбиранні режимів трипсинізації, на відміну від методики, запропонованої Вахоні та ін. [8], можна одержати ІСК без використання додаткових ферментів, причому властивості клітин, одержаних за нашою методикою, істотно не відрізняються від описаних Вахоні та ін. [8], Блюмом [2].

Результати попередніх внутріклітинних відведень мембранного потенціалу ІСК також показали, що описана нами методика дозволяє одержувати клітини з задовільними значеннями МП, R_m . Крім того, наявність спонтанної генерації ПД і пейсмерних потенціалів у скоротливих клітин дозволяє припустити, що дані ІСК більш близькі до свого природного стану, ніж одержані Папано і Сперелакіс [5], в яких не було спонтанних коливань МП. Слід відзначити, що одержані нами потенціали дії ІСК відрізняються від зареєстрованих в інтактному серці [4] тільки за амплітудою, часові ж характеристики залишились практично такими ж. Той факт, що досліджувані нами ІСК скорочувались і генерували ПД в розчині A_2 , позбавленому двовалентних іонів, поки важко пояснити. Результати досліджень у цьому напрямку будуть описані окремо.

Висновки

1. Досліджені ІСК в суспензії, одержаній трипсинізацією сердець новонароджених щуренят. Застосований «дробний» метод трипсинізації дозволяє одержувати велику кількість живих клітин без застосування додаткових ферментів.

2. Одержані ІСК мають характерні ознаки клітин серцевого м'яза, спонтанні скорочення.

3. З допомогою внутріклітинних відведень встановлено, що мембранний потенціал у різних ІСК коливається в межах 15—30 мВ, опір мембрани — в межах 30—70 Мом, залежно від розмірів клітини.

4. Всі скоротливі ІСК характеризуються спонтанними коливаннями мембранного потенціалу, які можна поділити на дві групи: типу пейсмеркерних потенціалів і типових потенціалів дії. Пропускання через мембрану гіперполяризуючого струму збільшує амплітуду ПД клітин другої групи і при певних величинах струму приводить до виникнення ПД в клітинах з пейсмеркерними потенціалами.

Література

1. Костюк П. Г.— Микроэлектродная техника, К., 1960.
2. Bloom S.— Science, 1970, 167, 3926, 1727.
3. De Haan R., Gottlieb S.— J. Gen. Physiol., 1968, 52, 4, 643.
4. Hoffmann B., Cranefield P.— Electrophysiol. of the Heart, N. Y., 1960.
5. Pappano A., Sperelakis N.— Amer. J. Physiol., 1969, 217, 4, 1076.
6. Rhodin J., del Missier P., Reid L.— Circulation, 1960, 24, 2, 2, 349.
7. Lehmkuhl D., Sperelakis N.— Amer. J. Physiol., 1963, 205, 6, 1213.
8. Vahouny G., Wei R., Starkweather R., Christopher D.— Science, 1970, 167, 3925, 1616.

Надійшла до редакції
4.VII 1974 р.

CERTAIN MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES
OF TRYPSINIZED CELLS IN HEARTS OF NEWBORN RATS

N. S. Veselovsky

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

Summary

The isolated heart cells (IHC) were studied in suspension obtained by «fractional» treatment with trypsin, without using additional enzymes. These IHC are similar to the ordinary myocardium cells and have spontaneous contractions.

Intracellular recording of the membrane potential showed that different cells have resting potential within a range of 15-30 mV; resistance — 30-70 MΩ, the latter correlated with the size of the cells. All beating IHC have spontaneous oscillations of the membrane potential which can be divided into two groups: cells with pacemaker oscillations and cells with typical action potentials. Hyperpolarization of the membrane increases the amplitude of the action potentials in the cells of the 2nd group and leads to appearance of the action potentials in the cells with pacemaker activity.

An assumption is advanced that only comparison of the electrophysiological and morphological data would make possible reliable identification of IHC in suspension.