

УДК 612.172

Н. Ф. Прончук

ВЛИЯНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЕЧНЫХ КЛЕТОК ТЕПЛОКРОВНЫХ В КУЛЬТУРЕ

Адренергическая регуляция деятельности сердца играет важную роль в приспособлении его к изменяющимся условиям внешней среды. Однако, механизмы, посредством которых катехоламины изменяют функциональные свойства сердечной мышцы, еще недостаточно изучены. Ждет своего окончательного разрешения вопрос о том, какой вид адренорецепторов находится в мембранах миокардиальных клеток и какова их роль в регуляции электрической и сократительной активности сердечной мышцы. Важное значение для понимания роли катехоламинов в деятельности сердца представляет изучение возможности их участия в осуществлении межклеточных взаимодействий. Современный подход к разрешению этих и целого ряда других вопросов физиологии и биофизики миокарда предполагает проведение экспериментов на клеточном уровне. Наиболее удачным объектом представляется группа жизнеспособных и нормально функционирующих клеток, свободных от гуморального и нервного контроля, существующего в целостном организме. Поэтому в последние годы внимание многих исследователей привлекает культура сердечных клеток [7, 12].

Миокардиальные клетки, выращенные на поверхности стекла, представляют собой действующую модель сердечной мышцы, функционирование которой можно длительное время поддерживать. Культивируемые клетки легко доступны для исследования их электрической и сократительной активности [1, 4, 9]. Отсутствие в культуре васкуляризации и иннервации позволяет изучать действие кардиотропных препаратов непосредственно на клетку и регистрировать ответные реакции [12].

Мы использовали культуру сердечных клеток для изучения влияния катехоламинов на их электрическую и сократительную активность.

Растущие в виде монослоя сердечные клетки получали по [2, 4, 8, 13 и др.] путем энзиматического расщепления извлеченных в стерильных условиях сердец новорожденных (двух—четырёхдневных) крысят на отдельные клетки и последующего их культивирования. В полученной суспензии изолированных сердечных клеток фермент ингибировали сывороткой крови, суспензию центрифугировали при малых оборотах, а образовавшийся клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде, содержащей сыворотку. Полученную взвесь клеток разливали во флаконы с находящимися в них покровными стеклами и культивировали при 36,5° С.

Морфологически в культуре сердечных клеток можно различить два типа клеток: *М* — миобластоподобные и *Ф* — фибробластоподобные.

Клетки типа *М* обладают плотной цитоплазмой со множеством саркосом, плотным, круглым, эксцентрично расположенным ядром, содержащим одно, изредка — два ядрышка. Форма их неправильная, отростчатая. Цитоплазма фибробластоподобных клеток светлая, прозрачная, с малым количеством внутриклеточных включений. Ядро овальной формы, с двумя-тремя ядрышками, светлое, расположено в центре клетки. Этот тип клеток характеризуется более правильной, часто округлой формой.

Размеры клеток в культуре составляют в среднем 50—70 мкм в длину и 10—40 мкм в ширину.

В течение 24 ч от начала культивирования почти все клетки прикрепляются к стеклу и расплатываются по его поверхности. *М*-клетки спонтанно пульсируют с частотой 40—120 сокращений в мин. На вторые сутки у клеток появляются протоплазматические отростки, с помощью которых они вступают в контакт друг с другом, и сокращения их при этом синхронизируются. Образуются различные по величине группы клеток — кластеры, клетки которых сокращаются в одном ритме. На третьи-шестые сутки культивирования величина кластеров становится достаточной для установления между ними контакта и синхронизации сокращений соседних кластеров. Обычно кластеры контактируют между собой посредством *М*-клеток, но иногда связующим звеном для двух близлежащих кластеров служат *Ф*-клетки. Такой вид роста и взаимодействия миокардиальных клеток принято называть плотной культурой (*dense culture*). В так называемой «редкой культуре» (*sparse culture*) сердечные клетки располагаются изолированно друг от друга или группами, каждая из которых сокращается в своем ритме. Внутри группы сокращения клеток синхронизованы.

Изучение и регистрацию спонтанной электрической активности культивируемых сердечных клеток мы производили с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов сопротивлением 40—60 МОм. Было обнаружено, что на вторые-третьи сутки культивирования около 50% исследованных клеток в культуре обладают спонтанной активностью. При этом потенциал покоя составлял в среднем 40—60 мВ, амплитуда потенциала действия — 70—100 мВ. У некоторых клеток регистрировали плато. Овершут

потенциала действия составлял в среднем 10—15 мВ. Спонтанная генерация пиков происходила с частотой 60—140 в мин и сопровождалась одновременными сокращениями клеток (рис. 1).

Таким образом, основные электрофизиологические показатели, зарегистрированные у сердечных клеток, выросших в культуре, очень напоминают наблюдаемые у клеток интактного сердца.

По поводу влияния адренергической стимуляции на сердечные клетки в культуре не существует единого мнения. Так, выдвигается точка зрения, что культивируемые клет-

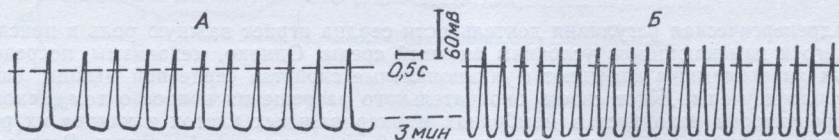


Рис. 1. Влияние норадреналина на спонтанную электрическую активность сердечных клеток в культуре.

А — спонтанная электрическая активность миокардиальной клетки в кластере; Б — ускорение спонтанной генерации пиков после введения в культуральную среду $2 \cdot 10^{-6}$ моль норадреналина.

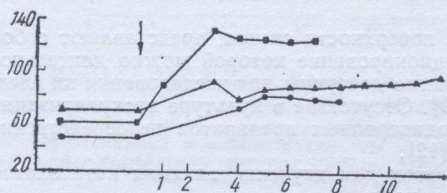


Рис. 2. Графическое изображение электрических реакций культивируемых клеток на воздействие норадреналина (стрелка).

По вертикали — количество пиков в 1 мин, по горизонтали — время регистрации, в мин.

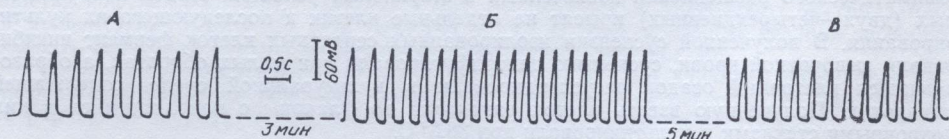


Рис. 3. Влияние β -адреноблокатора пропранолола на развитие вызванной норадреналином электрической реакции миокардиальной клетки в кластере.

А — спонтанная электрическая активность миокардиальной клетки в кластере; Б — ускорение спонтанной генерации пиков после введения в культуральную среду $2 \cdot 10^{-6}$ моль норадреналина; Б' — восстановление исходной частоты генерации пиков после введения β -блокатора пропранолола на фоне действия норадреналина.

ки не чувствительны к воздействию адренергических веществ [9, 13]. Отрицательные результаты своих экспериментов авторы объясняют тем, что в процессе приготовления культуры, по-видимому, повреждаются структурные образования в мембранах сердечных клеток, в том числе и β -адренорецепторы, и клетки теряют способность ответа на стимуляцию катехоламинами [9, 13].

С другой стороны, есть данные о том, что воздействие катехоламинами вызывает у сердечных клеток в культуре положительные хроно- и инотропные реакции [1, 3, 5, 6, 11, 14].

В наших экспериментах культивируемые сердечные клетки давали выраженные хронотропные реакции в ответ на введение в культуральную среду катехоламинов — адреналина и норадреналина. Было обнаружено, что оптимальной действующей дозой адреналина является концентрация $2 \cdot 10^{-6}$ моль, норадреналина — $2 \cdot 10^{-5}$ моль. Одновременно с учащением пульсаций клеток наблюдалось усиление сокращений — положительный инотропный эффект. Действие катехоламинов начиналось через 2—3 мин после введения их в культуральную среду и продолжалось в течение 20—30 мин (рис. 2). Мы также наблюдали, что адреналин увеличивает количество спонтанно сокращающихся клеток в культуре. Наши результаты согласуются с литературными данными [10] о том, что количество сокращающихся клеток после воздействия адреналина может увеличиться на 30%. В некоторых случаях катехоламины возобновляли пульсации в клетках, утративших по каким-либо причинам способность к сокращению. В этом отношении наши наблюдения согласуются с данными [6] о способности катехоламинов восстанавливать сокращения клеток в монослойной культуре.

Изучая электрическую активность культивируемых миокардиальных клеток при воздействии катехоламинов, мы регистрировали учащение генерации спонтанных потенциалов действия. Потенциал покоя и амплитуда потенциала действия при этом существенно не изменялись (рис. 1).

Предварительное применение пропранолола предотвращало развитие как электрической, так и сократительной реакции на последующее воздействие катехоламинами. Если β -блокатор добавляли в культуральную среду после введения катехоламинов — это приводило к сокращению продолжительности действия катехоламинов и восстановлению исходной частоты генерации пиков или первоначальной частоты сокращений (рис. 3).

Выводы

1. Культивируемые сердечные клетки представляют собой удобный объект для исследования функциональных свойств сердечной мышцы на клеточном уровне.
2. В процессе культивирования сохраняются основные функциональные свойства сердечных клеток: возбудимость, сократимость и способность к ритмической автоматии.
3. Сердечные клетки в культуре сохраняют способность ответа на стимуляцию катехоламинами, что указывает на наличие в их мембранах β -адренорецепторов.

Литература

1. Геворкян Р. А., Манукян Г. А. Культура эмбрионального миокарда как модель для изучения действия кардиоактивных препаратов.— Актуальные вопросы кардиологии, Каунас, 1975, с. 51—52.
2. Гуревич М. И., Веселовский Н. С. Изучение электрической активности одиночных сердечных клеток в суспензии.— Проблемы общей и клинической физиологии сердечно-сосудистой системы, Киев, «Наукова думка», 1976, с. 65—76.
3. Boder G. B., Johnson I. S. Comparative effects of some cardioactive agents on automaticity of cultured heart cells.— J. Mol. Cell Cardiol. 1972, 4, p. 453—463.
4. DeHaan R. L., Gottlieb S. H. The electrical activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture.— Delop. Biol., 1967, 16, p. 216—249.
5. Ertel R. J., Clarke D. E., Chao J. C., Franke F. R. Autonomic receptor mechanisms in embryonic myocardial cell cultures.— J. Pharm. Exp. Ther. 1971, 178, p. 73—80.
6. Goshima K. Initiation of beating in quiescent myocardial cells by norepinephrine, by contact with beating cells and by electrical stimulation of adjacent cells.— Exp. Cell Res., 1974, 84, p. 223—234.
7. Halle W. Die Zelle in vitro als Modell in der experimentellen Zellbiologie, Biologie, und Medizin.— Biol. Rdsch., 1972, 10, N 4, p. 217—230.
8. Harary I. Studies on individual heart cells.— Circul. Res., 1964, 14—15, suppl. 2, p. 120—127.
9. Kaufmann R., Tritthart H., Rodenroth S., Rost B. Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen.— Pflug. Arch., 1969, 311, N 1, S. 25—49.
10. LeDouran G., Suignard G., Khaskyie A., Renaud D. Sensibilité aux catécholamines des cardiomyoblasts embryonnaires de poulet isolés en culture in vitro.— C. R. Acad. Sci., 1974, 278, N 23, p. 2943—2945.
11. Noda C., Yugari Y. Effect of catecholamines in restoring of beating of cultured rat heart cells treated with reserpine.— Jap. J. Pharm., 1973, 23, p. 839—846.
12. Shindler R. Use of cell culture in pharmacology.— Ann. Rev. Pharmacol., 1969, 9, p. 393—406.
13. Sperelakis N., Lehmkuhl D. Insensitivity of cultured chick heart cells to autonomic agents and tetrodotoxin.— Am. J. Physiol., 1965, 209, N 4, p. 693—698.
14. Wollenberger A. Bhythmic and arrhythmic contractile activity of single myocardial cells cultured in vitro.— Circul. Res., 1964, 14—15, suppl. 2, p. 184—201.

Отдел физиологии кровообращения
Института физиологии им. А. А. Богомольца, Киев

Поступила в редакцию
10.I 1978 г.