

КАРДИОМИОЦИТЫ В МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ КАТЕХОЛАМИНОВ И ГИПОКСИИ

В последние годы в качестве модели сердечной мышцы все шире используется монослойная культура миокардиальных клеток. Интерес к кардиомиоцитам в культуре вызван возможностью исследования их функциональных свойств вне влияний гуморальных и нервных факторов, а также свободным и быстрым доступом растворов тестируемых веществ непосредственно к мембране. В экспериментах на этом объекте решается широкий круг вопросов, касающихся генерации и проведения возбуждения в миокарде, механизмов электромеханической связи, влияния физиологически активных веществ и кардиотропных препаратов на миокард.

Мы исследовали особенности влияния катехоламинов и гипоксии на сократительную активность кардиомиоцитов в культуре. Эти факторы не только оказывают регулирующее влияние на деятельность сердечно-сосудистой системы, но играют существенную роль в патогенезе ряда заболеваний, в том числе ишемической болезни сердца.

Методика. Монослойную культуру кардиомиоцитов получали из сердец 2—4-дневных крысят. Извлеченные в стерильных условиях сердца разрезали на кусочки, промывали бескальциевым раствором и помещали в 0,04 % раствор трипсина, не содержащий ионов кальция и магния. После 30 мин инкубации в таком растворе кусочки миокарда подвергали «дробной трипсинизации», во время которой через каждые 5—7 мин производили смену диссоциирующего раствора. Получив суспензию, трипсин ингибировали сывороткой. Центрифугированием при малом числе оборотов отделяли кардиомиоциты от раствора ингибированного фермента и ресуспендировали в питательной среде 199, в которую добавляли 15 % сыворотки. Для культивирования суспензию разливали во флаконы с находившимися в них покровными стеклами.

Регистрацию сокращений кардиомиоцитов проводили фотоэлектрическим методом с помощью специального устройства [1], действие которого основано на модуляции светового потока сокращающейся клеткой. Это вызывает изменения тока, которые регистрируются в виде механограммы. Кривая фотоэлектрической записи отражает временное развитие цикла сокращения кардиомиоцита. На ней четко различаются фаза сокращения и фаза расслабления.

Катехоламины (изопреналин, норадреналин, фенилэфрин) и блокаторы адренорецепторов добавляли непосредственно в питательную среду в экспериментальной камере в количестве 0,01—0,1 мл концентрированного раствора до получения необходимой концентрации.

Гипоксические условия создавали посредством перфузии культуры кардиомиоцитов питательной средой, в которой кислород замещали азотом. Напряжение кислорода (P_{O_2}) контролировали непосредственно в камере с помощью прибора BGAS (Copenhagen).

Результаты и их обсуждение. После диссоциации миокарда новорожденных крысят многие клетки приобретают округлую форму. При электронномикроскопическом исследовании таких клеток обнаруживаются изменения локализации и структуры миофибрилл и митохондрий. При последующем культивировании наблюдается постепенное упорядочение ультраструктуры кардиомиоцитов [5]. Наиболее интенсивное восстановление происходит в первые трое суток культивирования, однако достаточного уровня дифференциации кардиомиоциты достигают через 6—14 сут культивирования [5, 6, 11].

В первые сутки культивирования кардиомиоциты оседают на дно флакона, распластываются по поверхности стекла и начинают ритмично сокращаться. Частота сокращений разных клеток варьирует от 10 до 120 сокращений в мин. На вторые сутки культивирования соседние

кардиомиоциты устанавливают контакты друг с другом с помощью отростков. При этом их сокращения синхронизируются, а несколько контактирующих клеток образуют синхронно пульсирующую группу — кластер. На третьи — шестые сутки культивирования наряду с формированием кластеров устанавливаются контакты между близлежащими группами, и образуется монослой синхронно сокращающихся клеток [2].

Важнейшим показателем функциональной целостности миокардиальной клетки является сохранность мембранных рецепторов, опосреду-

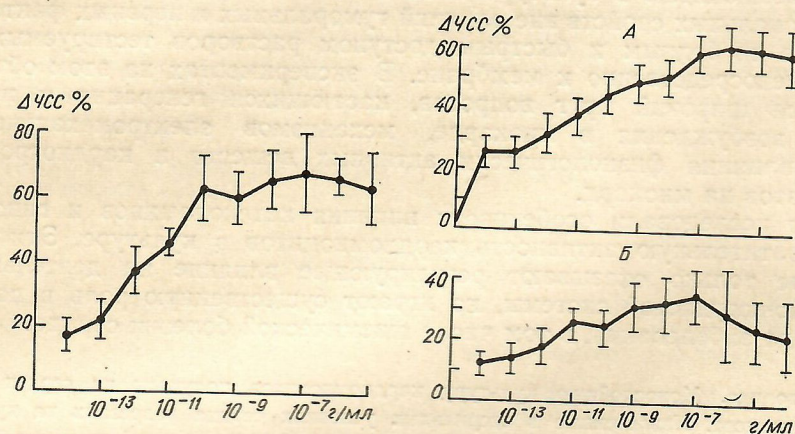


Рис. 1. Влияние изопреналина на частоту сокращений кардиомиоцитов в культуре. По горизонтали — концентрации изопреналина, по вертикали — прирост частоты сокращений в процентах к исходным значениям. Точки кривой представляют $M \pm m$ ($n=30$).

Рис. 2. Влияние норадреналина (А) и фенилэфрина (Б) на частоту сокращений кардиомиоцитов в культуре.

Условные обозначения см. рис. 1.

ющих действие физиологически активных веществ. Кардиомиоциты в культуре чувствительны к стимулирующему действию катехоламинов, которое реализуется через находящиеся в их мембранах β - и α -адренорецепторы. Наличие этих рецепторов показано с помощью конкурентного действия соответствующих специфических агонистов, антагонистов [4, 8] и радиоактивных лигандов [9, 10]. Расчеты показали, что на поверхности кардиомиоцита находится $2,5 \cdot 10^6$ — $3,6 \cdot 10^8$ мест связывания, взаимодействующих с агонистами адренорецепторов [10, 12].

Катехоламины оказывают положительное хроно- и инотропное влияние на кардиомиоциты в культуре. Пороговые концентрации катехоламинов, при которых отмечается учащение сокращений, существенно не отличаются и составляют $1 \cdot 10^{-14}$ г/мл для изопреналина, $2 \cdot 10^{-14}$ для норадреналина и $5 \cdot 10^{-14}$ для фенилэфрина.

Динамика развития положительного хронотропного ответа на введение каждого из трех агонистов сходна. Учащение сокращений отмечается уже через 20—30 с после поступления катехоламинов в среду. Через 2—3 мин нарастание частоты сокращений прекращается, и она остается относительно постоянной в течение 10—20 мин. При увеличении концентрации катехоламинов частота возрастает, но после достижения определенной концентрации дальнейшего учащения сокращений не происходит, достигается «уровень насыщения» реакции (рис. 1, 2). При дальнейшем увеличении концентрации катехоламинов сокращения замедляются и становятся аритмичными (рис. 1, 2). Максимальный прирост частоты сокращений кардиомиоцитов после введения изопреналина и норадреналина составляет 60—70 % по отношению к исходным значениям. Интенсивность положительной хронотропной реакции после введения фенилэфрина вдвое меньше.

Положительное инотропное действие на кардиомиоциты в культуре отмечается только в присутствии небольших концентраций катехол-

аминов. Оно проявляется в повышении амплитуды сокращений, а также увеличении максимальной скорости сокращения и максимальной скорости расслабления (рис. 3). Наиболее выраженное инотропное влияние оказывает изопrenalин при введении его в концентрациях $1 \cdot 10^{-13}$ — $1 \cdot 10^{-11}$ г/мл. После его поступления в культуральную среду наблюдается статистически достоверное увеличение амплитуды сокращений подавляющего большинства клеток в среднем на 14 %. Одновременно значительно возрастают (рис. 4) скорость сокращения и расслабления (в среднем на 50 %). Норadrenalин оказывает менее

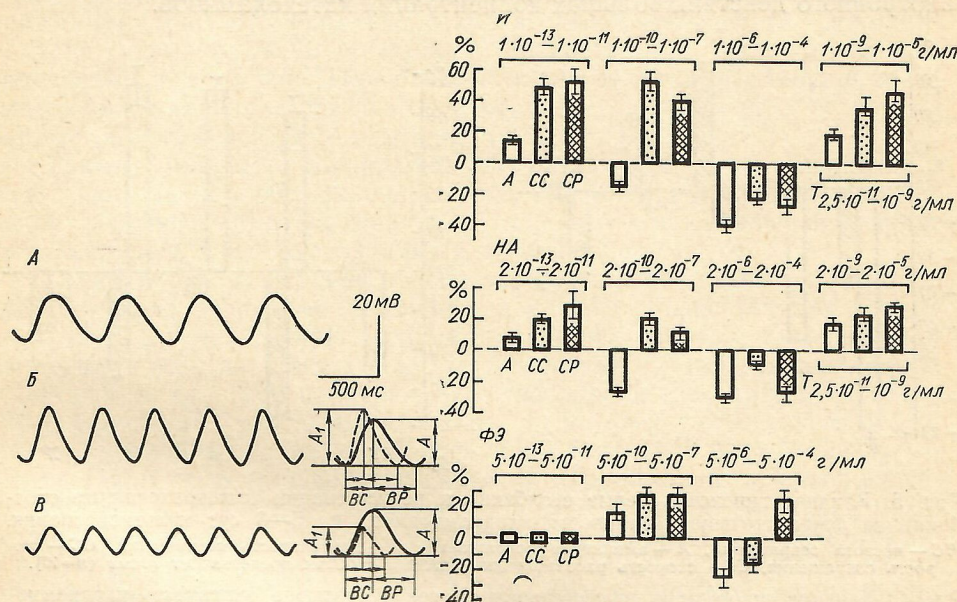


Рис. 3. Влияние изопrenalина на сократительную активность кардиомиоцитов. А — спонтанные сокращения; В — положительный инотропный эффект после введения изопrenalина в концентрации $1 \cdot 10^{-10}$ г/мл, А, А₁ — амплитуда сокращения, ВС — время достижения пика сокращения, ВР — время расслабления; В — угнетение сократительной активности кардиомиоцитов после увеличения концентрации изопrenalина до $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл.

Рис. 4. Влияние возрастающих концентраций изопrenalина (И), норadrenalина (НА) и фенилэфрина (ФЭ) на сократительную активность кардиомиоцитов. Т — на фоне предварительного введения талинолола. А — амплитуда сокращений, СС — скорость сокращения, СР — скорость расслабления. Каждый столбик представляет $M \pm m$ ($n=14-16$).

выраженное инотропное влияние при введении в аналогичных концентрациях (рис. 4).

Увеличение концентрации катехоламинов несколько меняет характер реакций кардиомиоцитов. При умеренных концентрациях изопrenalина и норadrenalина (10^{-10} — 10^{-7} г/мл) происходит снижение амплитуды сокращений и прекращается прирост скорости сокращения и расслабления. Под влиянием фенилэфрина в таких же концентрациях амплитуда сокращений возрастает в среднем на 17 %, а скорость сокращения и расслабления увеличиваются на 26—28 % (рис. 4).

При дальнейшем увеличении концентрации катехоламинов действие их на миокардиальные клетки в культуре приобретает характер отрицательного инотропного. Введение катехоламинов в больших концентрациях (10^{-6} — 10^{-4} г/мл) наряду со значительным снижением амплитуды сокращений приводит к уменьшению скорости сокращения и расслабления ниже исходных значений (рис. 4).

Отрицательное инотропное влияние больших концентраций катехоламинов можно предотвратить предварительным введением β -блокаторов талинолола или пропранолола в концентрации $2,5 \cdot 10^{-11}$ — $2,5 \cdot 10^{-9}$ г/мл. При последующем введении катехоламинов в подавляющем большинстве случаев отмечается увеличение амплитуды, скорости сокращения и расслабления кардиомиоцитов (рис. 4).

Положительное инотропное влияние катехоламинов на кардиомиоциты в культуре, по-видимому, связано с увеличением входа кальция в клетки. Ослабление эффекта по мере увеличения концентрации катехоламинов вызвано чрезмерным накоплением кальция в цитоплазме, в результате чего не происходит полного расслабления сократительных структур, что приводит к уменьшению скорости расслабления кардиомиоцитов, снижению амплитуды и скорости сокращения. Предварительное введение β -блокаторов, препятствуя чрезмерному поступлению кальция в цитоплазму, способствует реализации положительного инотропного действия больших концентраций катехоламинов.

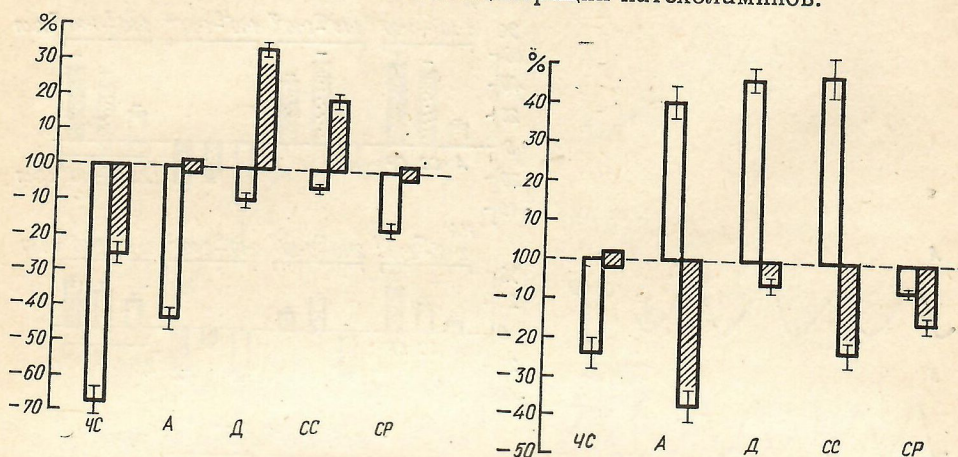


Рис. 5. Влияние гипоксии (белые столбики) и реоксигенации (заштрихованные столбики) на сократительную активность кардиомиоцитов на 5—6 сут культивирования. ЧС — частота сокращений, А — амплитуда сокращений, Д — длительность сокращений, СС — скорость сокращения, СР — скорость расслабления. Каждый столбик представляет $M \pm m$ ($n=10$).

Рис. 6. Влияние гипоксии и реоксигенации на сократительную активность кардиомиоцитов на 2—4 сут культивирования. Условные обозначения см. рис. 5.

В механизме угнетающего действия больших доз катехоламинов на сократительную активность кардиомиоцитов существенная роль может принадлежать гипоксии. В следующей серии экспериментов нами убедительно показано, что дефицит кислорода действительно приводит к снижению сократительной активности изолированных кардиомиоцитов в культуре, сходному по проявлению с наблюдаемым при воздействии больших доз катехоламинов, что косвенно подкрепляет наше предположение.

Показано, что интенсивность сократительной реакции зависит от уровня P_{O_2} в среде. При P_{O_2} , равном 35—30 мм рт. ст. (46,6 гПа), через 5—7 мин от момента поступления в камеру гипоксического перфузата отмечается постепенное снижение частоты, амплитуды и длительности сокращений. Скорость сокращения уменьшается мало, скорость расслабления — более заметно (рис. 5). Через 25—30 мин у трети клеток сократительная активность полностью прекращается.

При снижении P_{O_2} до 25—20 мм рт. ст. (33,3—26,6 гПа) начало реакции отмечается уже через 1—2 мин от момента смены перфузата, развитие ее происходит намного быстрее, и через 6—12 мин наблюдается полное угнетение сокращений кардиомиоцитов.

Реоксигенация культуры (возобновление нормоксической перфузии) в течение 10—12 мин приводит к восстановлению исходной амплитуды сокращения и скорости расслабления кардиомиоцитов. Частота сокращений остается ниже исходной, а длительность и скорость сокращения заметно возрастают (рис. 5). При этом длительность сокращения увеличивается за счет замедления фазы расслабления.

Таким образом, кратковременное воздействие гипоксии на кардиомиоциты в культуре, несмотря на значительное угнетение сократитель-

ной активности, не вызывает грубых функциональных нарушений в клетках.

Нами отмечены также особенности ответа миокардиальных клеток на гипоксию и реоксигенацию в зависимости от длительности их культивирования. Представленная выше динамика и характер реакции на недостаток кислорода в перфузате наблюдаются у кардиомиоцитов, находившихся в культуре от 5 до 8 сут. В более ранние сроки культивирования (2—4 сут) приблизительно у половины клеток отмечается первоначальное возрастание амплитуды, скорости и длительности сокращения. Частота сокращений и скорость расслабления несколько снижаются (рис. 6). Усиление сократительной активности сменяется ее угнетением, а затем и полным прекращением через 6—12 мин гипоксической перфузии. При реоксигенации частота сокращений таких клеток восстанавливается до контрольной, но значения остальных параметров остаются ниже исходных (рис. 6).

Такие изменения сократительной активности кардиомиоцитов в начальные сроки культивирования под влиянием гипоксии и последующей реоксигенации указывают на то, что клетки еще не вполне восстановились после диссоциации и легко повреждаются.

Таким образом, кардиомиоциты новорожденных крысят в культуре чувствительны к недостатку кислорода в среде. Реоксигенация восстанавливает сократительную активность кардиомиоцитов после кратковременной гипоксии. Следует отметить, что этим клетки новорожденных животных в культуре отличаются от изолированных кардиомиоцитов [7] и сердца [8] взрослых животных, в которых реоксигенация углубляет вызванные даже кратковременной гипоксией нарушения. Механизмы такой относительной устойчивости кардиомиоцитов новорожденных крысят в культуре к гипоксии, значение фактора снижения оксигенации в механизме угнетающего действия больших доз катехоламинов на изолированные кардиомиоциты представляют существенный интерес для физиологии сердца и клиники и требуют дальнейшего изучения.

М. И. Гуревич, Н. Ф. Прончук

CARDIOMYOCYTES IN MONOLAYER CULTURE AND CATECHOLAMINE AND HYPOXIA EFFECT ON THEM

Catecholamines administered in small concentrations into the perfusate exert positive inotropic effect on cardiomyocytes. Increased catecholamine concentrations make this action a negative inotropic one. Preliminary administration of β -adrenoblockers into the perfusate prevents an inhibiting effect of high catecholamine concentrations. Positive inotropic influence of catecholamines on cardiomyocytes in the culture is associated with the intensified income of Ca^{++} into cardiomyocytes. Oxygen deficiency in the perfusate decreases the contractile activity of cardiomyocytes. Reduction of the reaction intensity and development rate depends on the P_{O_2} level. Reoxygenation rehabilitates the contractile activity of cardiomyocytes in newborn rats. So, cells of the newborn rats in the culture differ from those of adult animals whose reoxygenation intensifies hypoxia-induced disturbances. Reasons of higher resistance of newborn rat cardiomyocytes in the culture to hypoxia necessitate further investigation.

A. A. Bogomolets Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Гуревич М. И., Литовченко Л. П., Онищенко П. М., Прончук Н. Ф. Установка для синхронной регистрации электрической и сократительной активности миокардиальных клеток в культуре.— Физиол. журн., 1980, 26, № 1, с. 132—135.
2. Гуревич М. И., Прончук Н. Ф. Культура миокардиальных клеток как модель для изучения влияния адренергической стимуляции на сердечную мышцу.— Физиол. журн., 1978, 24, № 6, с. 829—839.