

залось, что отсутствие азида натрия и повышение температуры инкубации до 37 °C не увеличивает частоты обнаруживаемых АСК. Эти данные свидетельствуют о том, что либо Т-лимфоциты одинаково хорошо связывают корпускулярный антиген стафилококка в обоих случаях, либо они не связывают исследуемый антиген вообще (по крайней мере при описанных условиях).

Поскольку в результате обработки лимфоцитов антииммуноглобулиновой сывороткой лимфоциты, выделенные из селезенки и лимфатических узлов, полностью теряют способность связывать стафилококк (независимо от температуры и наличия азида натрия), был сделан вывод, что все обнаруживаемые в настоящей работе АСК являются В-лимфоцитами. Этот вывод подтверждает также тот факт, что среди просмотренных 80 100 тимоцитов нами не обнаружено ни одной АСК. Другие лимфоидные органы содержат различный процент стафилококк-специфичных АСК. Максимальная частота АСК (0,02—0,10 %) обнаруживается в селезенке. Среди лимфоцитов, выделенных из костного мозга и лимфоузлов, частота АСК была всегда ниже (0,005—0,020 %), что связано, по-видимому, с меньшим содержанием в этих органах зрелых В-клеток.

Таким образом, лимфоидные органы мышей линии СВА содержат различный процент АСК, специфичных к корпускулярному антигену стафилококка. Связывание стафилококка лимфоидными клетками не зависит от температуры и присутствия азида натрия, но полностью подавляется антииммуноглобулиновой сывороткой. Обнаруживаемые в настоящей работе АСК являются В-лимфоцитами.

Список литературы

1. Брондз Б. Д., Рохлин О. В. Молекулярные и клеточные основы иммунологического распознавания.— М.: Наука, 1978.— 335 с.
2. Ada G. L. Antigen binding cells in tolerance and immunity.— *Transplant. Rev.*, 1970, 5, p. 105—129.
3. Forni L. Reagents for immunofluorescence and their use for studying lymphoid cell products.— In: *Immunological Methods*. New York: Akad. press, 1978, p. 151—168.
4. Ghetie V., Nilsson K., Sjoquist J. Identification of cell surface immunoglobulin marker by protein A containing fluorescent staphylococci.— *Scand. J. Immunol.*, 1974, 3, p. 397—403.
5. Hammerling G. J., McDevitt H. O. Antigen binding T and B lymphocytes. 1. Differences in cellular specificity and influence of metabolic activity on interaction of antigen with T and B cells.— *J. Immunol.*, 1974, 112, N 5, p. 1726—1733.
6. Hertel-Wulff B. An *in vitro* assay for the quantification of phagocytic cells of different anatomic origin.— *Acta path. microbiol. scand., Sect. C*, 1977, 85, p. 253—259.
7. Kennedy L. J., Dorf M. E., Unanue E. R., Benacerraf B. Binding of poly(Glu⁶⁰Ala³⁰Tyr¹⁰)ny thymic lymphocytes from genetic responder and non-responder mice: effect of antihistocompatibility serum.— *J. Immunol.*, 1975, 114, p. 1670—1675.
8. Patterson-Delafield J., Lehrer R. I. A simple microscopic method for identifying and quantitating phagocytic cells *in vitro*.— *J. Immunol. Meth.*, 1977, 18, p. 377—379.
9. Raff M. C., Feldman M., De Petris S. Monospecificity of bone marrow-derived lymphocytes.— *J. Exp. Med.*, 1973, 137, N 4, p. 1024—1030.
10. Warner N. L. Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T lymphocytes.— *Adv. Immunol.*, 1974, 19, p. 67—216.

Кафедра микробиологии и иммунологии
Киевского университета

Поступила в редакцию
14.V 1980 г.

УДК 612.127—008.9—097.3—085.273.53

Р. И. Янций

ОБ УЧАСТИИ ГИСТАМИНА В РАЗВИТИИ АКТИВИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ НА МЫШЕЧНЫЕ ВОЛОКНА ПРЕДСЕРДИЙ МОРСКОЙ СВИНКИ

В исследованиях, проведенных в отделе иммунологии и цитотоксических сывороток, направленных на выяснение механизма действия антител (в частности, антикардиальных), было показано их влияние на электрическую и сократительную активность миокардиальных клеток и установлена фазность в развитии функциональных измене-

ний, зависящая от первоначально стимула. Сменялся потенциалности. Применение тальные данные по комплексу антиген-система медленных частоты электрической активности и прироста

Однако остается с прямым действием. Гистамин называются гистаминового комплекса антигенных Na-Ca каналов. Изучение этого исследования.

Мы изучали в активности предсердия из тучных клеток

Опыты проводились с использованием внутриклеточного действия (ПД) с одностороннего специфического гамма-глобулина титела после стандарта в разведении 1:8. Концентрация гамма-ка/мл. В контрольной крови неиммунной пороговой. Избирательные клетки осуществляли или длительной депрессии выхода гистамина — к фузионным растворам насыщения газовой

Прежде чем протекать и сократившись произвести его эффект в омывающем растворе при отсутствии стимула представлены на рисунке ионы калия и соединяются с устойчивой деполяризации электрические ответы (ПД) туда, исчезает плато. Ответы, которые ген — антитело выделяет — кальциевых каналов. Действительно, при действии уже к 3—5 мин наблюдается ответов. Сам же либ на электрическую и через гистамин. Изве става высвобождает ких секунд [5].

ний, зависящая от дозы цитотоксинов и времени их воздействия. Так, развившийся первоначально стимулирующий эффект антикардиальных антител на сердечную мышцу сменялся постепенным и стойким угнетением электрической и сократительной активности. Применение микроэлектродной техники и полученные с ее помощью экспериментальные данные позволили высказать предположение, что при образовании иммунного комплекса антиген — антитело на клетках сократительного миокарда затрагивается система медленных Na-Ca каналов. Это выражается в удлинении плато ПД, нарастании частоты электрических ответов, что приводит к увеличению силы, скорости нарастания и прироста сокращений в лестнице Боудича [3, 4].

Однако остается неясным вопрос о том, связаны ли изменения сердечной мышцы с прямым действием антител на возбудимую мембрану клеток миокарда, либо они вызываются гистамином, высвобождающимся из тучных клеток при образовании иммунного комплекса антиген — антитело, являющимся, как известно [1], активатором медленных Na-Ca каналов. Выяснение данного вопроса определило цель и задачу настоящего исследования.

Мы изучали влияние антикардиальных антител на электрическую и механическую активность предсердных волокон в условиях предварительного высвобождения гистамина из тучных клеток или при его блокаде.

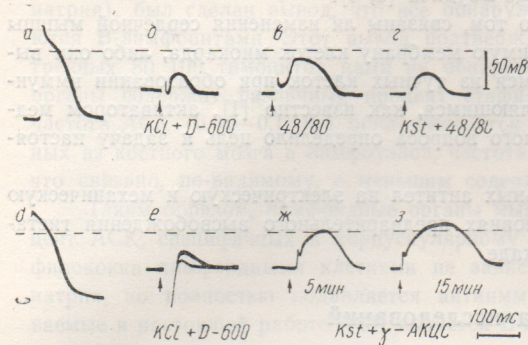
Методика исследований

Опыты проведены на изолированных предсердиях морских свинок с использованием внутриклеточного отведения (плавающими микроэлектродами) потенциалов действия (ПД) с одновременной регистрацией изометрического напряжения. Для получения специфической, антикардиальной цитотоксической сыворотки и выделения из нее гамма-глобулина пользовались способом, описанным ранее [4]. Специфические антитела после стандартизации их титра реагировали в реакции связывания компонента в разведении 1:800. В опыте гамма-глобулин разводили раствором Тироде по белку. Концентрация гамма-глобулина в тестирующем растворе составляла 0,1—0,5 мг белка/мл. В контрольных опытах использовали гамма-глобулин, выделенный из сыворотки крови неиммунизированных кроликов. Стимуляцию препаратов осуществляли прямоугольными импульсами тока, длительностью 3—5 мс. Сила тока всегда была сверхпороговой. Избирательное блокирование ионно-транспортных систем миокардиальной клетки осуществляли с помощью ТТХ — $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл, соединением Д-600 — $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл, или длительной деполяризацией (до 30 мин) хлористым калием. Использовали либератор выхода гистамина из тучных клеток — вещество 48/80 — $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл, блокатор выхода гистамина — клемастин — $5 \cdot 10^{-8}$ г/мл. В течение всего эксперимента через перфузионные растворы пропускали карбоген (98 % O_2 и 4 % CO_2), pH растворов после насыщения газовой смесью составил 7,3—7,4. Опыты проводили при температуре 36 °C.

Результаты исследований и их обсуждение

Прежде чем приступить к выяснению вопроса о роли гистамина в изменении электрической и сократительной активности при действии антител, целесообразно было воспроизвести его эффекты именно в той концентрации, которая может быть достигнута в омывающем растворе из тучных клеток изолированного предсердия морской свинки, но при отсутствии специфических антител. Результаты одного из опытов данной серии представлены на рисунке (а—в), из которого следует, что при совместном действии ионов калия и соединения Д-600 спонтанная активность прекращалась, развивалась стойкая деполяризация клеток, составляющая 50—60 % исходной величины ПП. Электрические ответы (ПД) претерпевают значительные изменения, уменьшается их амплитуда, исчезает плато. В ответ на приложенный электрический стимул возникают медленные ответы, которые почти полностью блокируются Д-600. Если при реакции антиген — антитело выделяется гистамин, который является активатором медленных натрий-кальциевых каналов, то он должен вызвать увеличение медленных ответов. Действительно, при действии на сердечные клетки либератора гистамина (вещество 48/80), уже к 3—5 мин наблюдалось увеличение амплитуды и продолжительности медленных ответов. Сам же либератор выхода гистамина, как и его блокатор, не влияет первично на электрическую и механическую активность [2]. Их действие опосредовано только через гистамин. Известно также, что вещество 48/80 в среде нормального солевого состава высвобождает более 90 % содержащегося в клетках гистамина в течение нескольких секунд [5].

Однако, при сравнении действия веществ 48/80 на электрическую активность предсердных волокон с действием антител было отмечено достоверное отличие. Кардиостимулирующее действие антител на ПД превышало эффекты 48/80 как по силе, так и по продолжительности вызываемых изменений ($p < 0,05$). В условиях блокады выхода гистамина клемастином вещество 48/80 становилось малоэффективным (см. рисунок, *г*). Получив результаты непосредственного действия гистамина на электрическую и механическую активность, мы пытались выяснить истинный вклад (исключая гистамин) в данном процессе. Действие антител, как видно из рисунка, *ж*, было своеобразным, и ре-



Усиливающий эффект антител на медленные ответы, подавленные соединением Д-600 и в условиях блокады выхода гистамина из тучных клеток.

а — ПД в растворе Тироде; *б*, *г* — медленный ответ при совместном действии KCl (20 ммоль) и Д-600 ($1 \cdot 10^{-6}$ г/мл); *в* — 5 мин действия либератора выхода гистамина, вещества 48/80; *г* — неэффективность вещества 48/80 в условиях блокады выхода гистамина клемастином ($0,5 \cdot 10^{-7}$ г/мл); *ж*, *з* — эффекты иммунного гамма-глобулина в условиях «выключения» быстрых и медленных Na-Ca каналов и блокады выхода гистамина во время реакции антиген-антитело. Частота стимуляции 1,5 Гц. Нулевой мембранный потенциал указан горизонтальными пунктирными линиями.

гистрируемые ответы отличались от полученных в «интактных» препаратах предсердия морской свинки. Прежде всего, обращает на себя внимание замедление восходящей фазы регенеративных ответов. Однако, несмотря на блокаду выхода гистамина, антитела все же вызывали в данном случае расширение и увеличение медленных ответов. Последнее, как видно из рисунка, *з*, были «куполообразной» формы. Увеличение и удлинение медленных ответов сопровождалось появлением и пролонгированием сокращений, тогда как выделенного гистамина (при действии одного 48/80) было недостаточно для инициации отдельного механического ответа. В условиях нормального функционирования быстрых Na и медленных Na-Ca каналов, блокада выхода гистамина из тучных клеток не устраняла развитие положительной хроноинотропии антител. В опытах, допускающих участие гистамина в развитии реакции антиген — антитело, его эффекты не вызывали достоверных изменений в электрической и сократительной активности предсердных волокон ($p > 0,05$). Его действие было слабовыраженным и скоропреходящим, напоминающим эффекты неиммунного гамма-глобулина.

Таким образом, анализ экспериментального материала убеждает в том, что главным звеном в сложной иммунологической реакции антиген — антитело является все же непосредственное действие антител на мембрану миокардиальных клеток, приводящее к изменению ее антигенных детерминант, затрагивающих при этом систему каналов, ответственных за активацию входящего тока во время генерации плато ПД. Это вытекает прежде всего из того, что высвобождение гистамина наступает значительно раньше (1–2 мин), тогда как действие антител и наблюдаемые их эффекты развивались с относительно большим латентным периодом и сохранялись до 15–20 мин. Кроме того, по логике вещей не может быть, чтобы клетка «не знала» о посадке на ее антигенную детерминанту антитела и не ответила на это изменением своего функционального состояния. Увеличение амплитуды и длительности медленных ответов при действии противосердечных антител свидетельствует об изменении мембранной «архитектуры» клеток, что приводит к изменению частоты и амплитуды одиночных сокращений.

Сказанное, разумеется, не исключает и роли биологически активных веществ, высвобождающихся во время реакции образования иммунного комплекса антиген — антитело на миокардиальной клетке, поскольку их эффекты даже в условиях изолированной сердечной мышцы являются ощутимыми. Однако резонным является указание И. С. Гуццина [2] о том, что высвобождающегося во время реакции антиген — антитело гистамина недостаточно для того, чтобы вызвать изменения электрической и механической активности сердечной мышцы. Сам по себе гистамин вызывает стимулирующий эффект, активизирует медленные Na-Ca каналы [1], но в значительно больших концентрациях (0,01–0,1 г/мл). Вряд ли можно допустить наличие в омывающем растворе такого ко-

личества гистамина. Кроме того, если локоны были связаны из тучных клеток в опытах не наблюдалось при истощении клеток.

Следовательно, могут быть объяснены антител активированные клетки. Полученные фронт нарастания, логически активных синергизм многих влияний одних веществ на лирированном предсердии, в частности, брадикардия отсутствуют. К Он не изменяет частоту цитотоксической реакции свинки [6].

Таким образом, вии антител на воз-

1. Ворновицкий Е. И. о механические условия выключения медицины, 1974, 1.
2. Гуццин И. С. Анастасия 175 с.
3. Ильевич Н. В., Сомовича в области химических сывороток.
4. Янций Р. И. Электроника на сердечной ткани.
5. Cochrane D. E., D. cytosin) in mast cells. Nat. Acad. Sci. USA.
6. Giotti A., Guidotti and noradrenaline (London), 1966, 1.

Отдел иммунологии
Института физиологии

личества гистамина, тем более в опытах на изолированном предсердии морской свинки. Кроме того, если бы эффекты положительной хроноинотропии миокардиальных волокон были связаны с действием одного гистамина, то в условиях блокады его выхода из тучных клеток противосердечные антитела оказались бы бездейственными. Такого в опытах не наблюдалось. Эффекты противосердечных антител сохранялись также и при истощении клеточных запасов гистамина, либератором его выхода из тучных клеток.

Следовательно, полученные данные о кардиостимулирующем действии антител могут быть объяснены в рамках представления о непосредственно прямой способности антител активировать медленный входящий ток клеточных мембран миокардиальных клеток. Полученные в опытах видоизмененные медленные ответы, особенно передний фронт нарастания, их «куполообразность» не исключают в данной реакции участие биологически активных веществ. Возможно, это эффекты не одного только гистамина, а синергизм многих биологически активных веществ, тем более, что доказано взаимное влияние одних веществ на высвобождение других [2]. Условия наших опытов на изолированном предсердии исключают действие некоторых биологически активных веществ и, в частности, брадикинина так как плазменные компоненты кининообразующей системы отсутствуют. К тому же его действие на сердце противоположно действию антител. Он не изменяет частоту сокращений, но уменьшает их силу [5]. Серотонин во время цитотоксической реакции вообще не высвобождается из миокардиальных клеток морских свинок [6].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о непосредственном действии антител на возбудимую мембрану миокардиальных клеток.

Список литературы

1. Ворновицкий Е. Г., Игнатъева В. Б., Ходоров В. И. Влияние гистамина на электрическую и механическую активность миокардиальных волокон сердца морской свинки в условиях выключения «быстрых» натриевых каналов.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1974, № 11, с. 23—26.
2. Гуцин И. С. Анафилаксия гладкой и сердечной мускулатуры.— М.: Медицина, 1973.— 175 с.
3. Ильчевич Н. В., Спасокукоцкий Ю. А., Алексеева И. Н. и др. Развитие идей А. А. Богомольца в области экспериментального изучения и применения в практике цитотоксических сывороток.— Физиол. журн., 1981, 27, № 3, с. 339—346.
4. Янций Р. И. Электрофизиологическое исследование действия антикардиальных антител на сердечную мышцу: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1980.— 21 с.
5. Cochrane D. E., Douglas W. W. Calcium-induced extrusion of secretory granules (exocytosis) in mast cells exposed to 48/80 or the ionophores A-23187 and X-537A.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, p. 408—410.
6. Giotti A., Guidotti A., Mannaioni P. E., Ziletti L. The influences of adrenotropic drugs and noradrenaline on the histamine release in cardiac anaphylaxis in vitro.— J. Physiol. (London), 1966, 184, p. 924—941.

Отдел иммунологии и цитотоксических сывороток
Института физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР

Поступила в редакцию
10.11 1982 г.