

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мелик-Мусян А. Б. Архив акадомии, гистологии, эмбриологии, 59, 30—28, 1971.
2. Смолянинов В. А. В кн.: Модели структурно-функциональной организации некоторых биологических систем. 203—363. М., 1966.
3. Экклс Дж. Тормозные пути центральной системы. М., 1971.
4. Brown F. E., Hoffer B. J., Siggins G. P. Brain Res., 27, 501—521, 1971.
5. Eccles J. C., Ito M., Szentagothai J. The Cerebellum as a Neuronal Machine, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
6. Grant R., Phillips C. G. J. Physiol. (London), 133, 529—547, 1956.
7. Hamori T., Szentagothai J. Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 15, 95—117, 1964.
8. Ito M. The Cerebellum and Neural Control, Raven Press, New York, 1974.
9. Larramendi L. M. N., Lenkey-Johston N. J. Comp. Neurol., 138, 451—482, 1970.
10. Lenkey-Johston N., Larramendi L. M. N. J. Comp. Neurol., 131, 73—112, 1968.
11. Magnani E., Walberg F. Exp. Brain Res., 4, 212—233, 1967.
12. Palay S. L., Chan-Palay V. Cerebellar Cortex. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1974.
13. Palkovits M., Mezgyan, Hamori J., Szentagothai J. Exp. Brain Res., 28, 189—209, 1977.
14. Sato Y., Kawasaki T., Kobayashi K. Brain Res., 272, 27—31, 1981.
15. Somoogy H., Mount M. L., Citrus A. Brain Res., 173, 1—21, 1979.

Поступило 25 I 1991 г.

Биолог. журн. Армении. № 2 (14) 1991

УДК 616.12:005.4—092.4/9—078.73

### НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В КАРДИОЛОГИИ: КАРДИОГЕННЫЕ ЦИТОКИНЫ И МИОТРОПНЫЕ ЛИМФОКИНЫ КАК ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ ФУНКЦИИ СЕРДЦА

В. А. МКРТЧЯН, К. Г. АДАМЯН, В. М. САМВЕЛЯН, Р. С. ГАБРИЕЛЯН,  
А. Ш. КАМАЛЯН, Л. Г. БУДАГЯН, М. В. ЛЬВОВ, Т. С. ЗАМИНЯН,  
Л. П. МИСКАРЯН, А. Б. НАРГИЗЯН, М. А. ЁСЛЯН, М. Ф. КАЗАРЯН,  
Л. В. КАРАНЕТЯН, Н. С. ГЕВОРКЯН

Институт кардиологии им. Л. А. Оганесяна МЗ Армении, Ереван

Впервые разработан способ получения кардиогенных цитокинов при помощи вирусных индукторов. На моделях эксплантатов эмбрионального миокарда и изолированного сердца изучено действие кардиогенных цитокинов на частоту и амплитуду сокращений.

*Քարտիզրգած են արտադրել քրտոկիններ, որոնք ազդում են սրտի ձկանային բջիջների էլեկտրական և կոնտրակտիլ շարժումների վրա:*

Cardiogen cytokins having influence on the electric activity and contraction of heart muscle cells are induced.

*Функции сердца—цитокины—лимфокины.*

Успехи, достигнутые за последние годы в области изучения медиаторов клеточного иммунитета, способствовали ряду открытий, имеющих большое значение для теоретической и практической медицины. В частности, выделены, охарактеризованы и классифицированы лимфокины человека и животных, изучены механизмы их действия на

клетки—мишени и, что особенно важно, разработаны принципиально новые способы лечения заболеваний, в патогенезе которых существенную роль играют иммунные механизмы [4—9].

Из данных второго собрания Британской группы по изучению лимфокинов и цитокинов [3], последние представляют группу клеточных регуляторов, которые продуцируются различными клетками и тканями и играют решающую роль при физиологических и патофизиологических реакциях.

В доступной нам литературе мы не нашли сведений относительно выработки цитокинов кардиомиоцитами животных и человека.

С целью изучения функциональных свойств кардиогенных цитокинов и митрогенных лимфокинов нами начиная с 1984 года проводились экспериментальные исследования, конкретные задачи которых сводились к следующему:

1) выяснить возможность выработки кардиогенных цитокинов у интактных животных с помощью вирусных индукторов;

2) изучить действие кардиогенных цитокинов на эксплантаты эмбрионального миокарда, изолированного сердца лягушки и сердца крыс *in vivo*;

3) исследовать влияние кардиогенных цитокинов на миграцию мышечных клеток и митрогенных лимфокинов на частоту и амплитуду сокращений эксплантатов эмбрионального миокарда и изолированного сердца.

**Материал и методика.** Для получения кардиогенных цитокинов использовали 50 беспородных крыс массой 150—180 г. Исходя из того, что некоторые вирусы и микроорганизмы стимулируют синтез лимфокинов и цитокинов [8], мы использовали вакцины вирусов эпидемического паротита и гриппа, любезно предоставленные нам чл.-корр. АН Аржентин Ю. Т. Александрином.

Вакцины в двойной дозе вводили внутривенно интактным животным. Через 3 дня под общим обезболивающим эфирным наркозом крыс лабиринт извлекали, помещали в чашку Петри с теплым физиологическим раствором. Затем его ножницами разделяли на 4 части, хорошо промыли и поместили во флаконы, содержащие 4 мл среды 199 с 15%ной телячьей сывороткой. Затем флаконы инкубировали в термостате при 37°. Через 24 ч из них удаляли кусочки сердца, а питательную среду центрифугировали 15 мин в режиме 3000 об/мин. Затем pipеткой отделивали надосадочную жидкость и переносили в другие флаконы. В ряде случаев (10 опытов) кусочки сердца инкубировали в среде 199, не содержащей телячьей сыворотки.

Для контрольных исследований использовали сувериганты, полученные при инкубации кусочков сердца 15 интактных крыс. Все процедуры проводили в стерильных условиях, используя стерильную, химически чистую посуду.

Функцию цитокинов изучали на 4 моделях опытов *in vitro* и *in vivo* на эксплантатах эмбрионального сердца кур, на изолированном сердце лягушек, на миграции мышечных клеток при помощи пепричного теста торможения миграции лейкоцитов и на сердце интактных крыс.

Использовали куриные эмбрионы 6—10-дневной инкубации по описанному методу [1]. Изолированное сердце лягушек получали по Штраубу. Инкубируемые растворы вводили после замены раствора Рингера в объеме 0,5—1 мл. При этом частоту и амплитуду сокращений, полученных при замене раствора Рингера в среде с кардиогенными цитокинами, сравнивали как с исходными величинами, так и с теми показателями, которые получали при замене раствора Рингера культуральной средой кусочков сердца интактных крыс и иммунизированных крыс, сердце которых инкубировали в бессывороточной среде.

При определении действия кардиогенных цитокинов на мышечные клетки в прямом тесте торможения миграции [2] использовали лейкоциты периферической крови больных ИБС.

Опыты *in vivo* проводили на беспородных крысах массой 150—200 грамм Под уретан-хлоридовым наркозом (заводили внутривенно, из расчета 1 и 50 мг/кг соответственно) животных переводили на искусственное дыхание и в бедренную вену устанавливали катетер для введения испытуемых растворов. Параметры ЭКГ определяли на электрокардиографе ЭЛКАР-2 во втором стандартном отведении.

Миотропные лимфоциты, в частности, фактор, угнетающий миграцию лейкоцитов, получали из супернатанта культуры лейкоцитов периферической крови больных ИБС, инкубированных в течение 24 ч с антигеном, приготовленным из миокарда. Как правило, дочерами лейкоцитов служили больные, имеющие положительные результаты теста торможения миграции лейкоцитов.

Для изучения сокращения эксплантатов эмбрионального миокарда выбраны следующие варианты опыта: 1. инкубация эксплантатов в среде 199 (контроль); 2. инкубация эксплантатов в культуральной среде при добавлении супернатантов, полученных после 24 ч инкубации кусочков сердца интактных животных (45 опытов) и иммунизированных вирусными вакцинами (75 опытов); 3. инкубация в культуральной среде при добавлении супернатантов, полученных при инкубации лейкоцитов больных ИБС (30 опытов).

Для исследований на сердце лягушек и крыс также использованы указанные варианты.

**Результаты и обсуждение.** Изучение электрограмм сокращений эксплантатов эмбрионального миокарда кур показало, что при внесении в культуральную среду супернатанта, полученного из культуральной жидкости кусочков сердца интактных крыс, не происходит существенных изменений частоты и амплитуды сокращений. Лишь через 30 мин после добавления супернатанта наблюдается некоторое падение частоты сокращений (рис. 1а). Из поставленных 45 опытов лишь в 3 случаях не зарегистрировано снижение частоты сокращений эксплантатов миокарда кур, что составляет 11,1%. При добавлении в культуральную среду супернатанта, полученного при 24-часовой инкубации кусочков сердца, иммунизированных вирусными вакцинами крыс (в объеме 0,5 мл), на электрограммах (сразу после добавления) регистрируется урежение частоты сокращений. Спустя 10 мин выявляется также уменьшение амплитуды сокращений. Через 20 мин описанные изменения нарастают и к 30 минуте полностью прекращается сокращение эксплантатов (рис. 1б).

Следует отметить, что во всех случаях использования супернатантов, полученных после 24-часовой инкубации кусочков сердца иммунизированных животных в среде, содержащей 15% телячьей сыворотки, результаты оказались однозначными—прекращение сокращений.

При использовании супернатантов, полученных из бессывороточной культуральной среды, в которой инкубировались кусочки сердца иммунизированных животных, в большинстве случаев не отмечалось прекращения сокращений эксплантатов сердца кур (из 30 опытов прекращение сокращений зарегистрировано лишь в 3 случаях). Через 10 и 20 мин регистрировалось некоторое нарушение частоты и сокращений, которые, однако, не прекращались к 30 минуте.

Анализ механограмм изолированного сердца лягушки на фоне нормальных спонтанных сокращений выявил угнетение амплитуды и изменение ритма при смене раствора Рингера на супернатант, полученный из культуральной жидкости кусочков сердца интактных животных, инкубированных 24 ч при 37°. После промывки раствором Рингера во всех 17 опытах наблюдалось постепенное самостоятельное восстановление амплитуды и частоты сокращений (рис. 2а). На

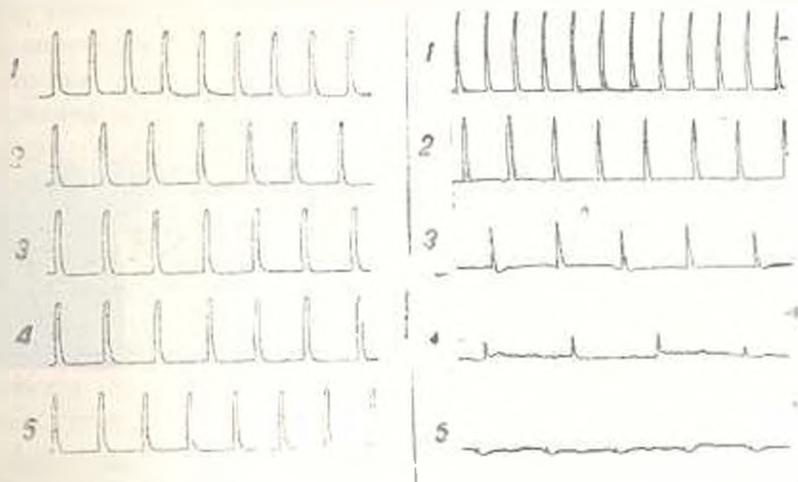


Рис. 1а. Электрограмма сокращений экзальтатов эмбрионального миокарда кур 6—8-дневной инкубации. 1—исходные сокращения; 2—добавление культуральной жидкости сердца интактных крыс в объеме 0,5 мл; 3—через 10 мин; 4—через 20 мин; 5—через 30 мин—наблюдается некоторое замедление сокращений

б. Электрограмма сокращений экзальтатов эмбрионального миокарда кур 6—8-дневной инкубации. 1—исходные сокращения; 2—добавление культуральной жидкости сердца крысы, иммунизированной вакциной эпилемического паротита (0,5 мл); 3—через 10 мин; 4—через 20 мин; 5—через 30 мин. Наступает полная остановка сокращений кардиомиоцитов.

фоне нормальных сокращений замена раствора Рингера супернатантом, полученным при инкубации кусочков сердца иммунизированных крыс (в среде, содержащей 15% телячьей сыворотки), приводила к мгновенной остановке сердца. Длительное время не регистрировались даже сокращения предсердий. Восстановление нормального сокращения достигалось лишь после многократных промывок сердца питательным раствором Рингера.

Следует отметить, что вакцина вируса эпидемического паротита и противогриппозная вакцина проявляли одинаковую активность, индуцируя выработку кардиогенных цитокинов из кусочков сердца, инкубированных в сывороточной среде (рис. 2б, в и рис. 3).

При замене раствора Рингера супернатантом культуры лейкоцитов больших ИБС, инкубированных с антигеном миокарда, наблюдалось резкое нарушение частоты (уменьшение) и амплитуды сокращений (во всех 12 опытах). Исходные параметры сокращений регистрировались лишь после многократной промывки сердца питательным раствором Рингера.

В опытах на наркотизированных крысах (*in vivo*) внутривенное введение супернатанта (полученного после 24-часовой инкубации кусочков сердца интактных крыс в сывороточной среде) даже в объеме 5 мл не приводило к изменению электрических параметров сердца

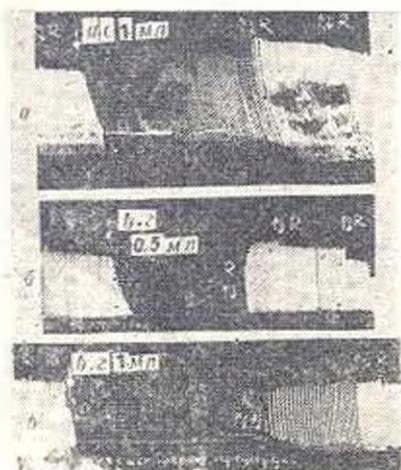


Рис 2

Рис 2. Механограмма сокращения изолированного по Штраубу сердца лягушки и на фоне исходных нормальных сокращений возникновение угнетения амплитуды и изменения ритма при полной замене раствора Рингера культуральной жидкостью кусочков интактного сердца крысы (Н. С. 1 мл (контрольные опыты). Показано постепенное самопроизвольное восстановление амплитуды и исчезновение брадикардии после промывания раствором Рингера

б) полная асистолия (остановка сердца) после замены раствора Рингера культуральной жидкостью сердца животного, иммунизированного вакцинной гриппа (в.г. 1 мл). Длительное время отсутствуют даже сокращения предсердий. Ритм и амплитуда сердечных сокращений восстанавливаются только после многократной промывки сердца питательным раствором Рингера.

Рис 3. Угнетение сокращений изолированного сердца лягушки после полной замены раствора Рингера культуральной жидкостью сердца интактного животного (Н. С. 1 мл) и постепенное восстановление амплитуды и ритма сокращения. Полная асистолия после введения культуральной жидкости сердца 2 мл, иммунизированной вакциной паротита (ч.п. 1 мл) и восстановление амплитуды и ритма только после многократных промываний сердца раствором Рингера.



Рис 3

в течение 60 мин наблюдения. В то же время введение супернатанта (полученного через 24 ч после инкубации кусочков сердца вакцинированных крыс в сывороточной среде) сопровождалось резкими изменениями ЭКГ параметров, вплоть до полной остановки сердца. При этом наблюдалось снижение комплекса RST ниже изоэлектрической линии, уширение комплекса QRS по типу блокады, нарушение коронарного кровообращения, появление суправентрикулярной экстрасистолы, выпадение нескольких желудочковых комплексов, резкое замедление ритма сокращений сердца и наступление полной асисто-

лин на фоне синоаурикулярной блокады. Сходные результаты были получены во всех 13 опытах этой серии.

Проведенные исследования показали, что после иммунизации животных вирусными вакцинами их миокард в условиях *in vitro* выделяет в культуральную жидкость цитокины, которые оказывают прямое действие на кардиомиоциты и изменяют их функцию. Естественно возник вопрос: будут ли эти кардиогенные цитокины оказывать подобное действие на сократительные структуры немышечных клеток? Для получения ответа на поставленный вопрос были поставлены *in vitro* две серии экспериментов с использованием непрямого теста торможения миграции лейкоцитов. Во всех случаях в качестве тест-культуры использовали лейкоциты периферической крови больных ИБС, давших положительные результаты при прямом тесте ингибирования миграции в присутствии сердечного антигена.

В первой серии в культуральную жидкость (80 камер) добавляли супернатанты, полученные из инкубационной среды, в которой сердечный антиген вызывал угнетение миграции клеток. Контрольные камеры (80 опытов) инкубировали только со средой 199. Во второй серии эксперимента (80 камер) в культуральную жидкость добавляли кардиогенные цитокины.

Анализ результатов исследований обеих серий показал, что кардиогенные цитокины аналогично фактору, угнетающему миграцию лейкоцитов, также подавляют миграционную способность лейкоцитов. Так, в первой серии опытов угнетение миграции выявлено в 72, во второй — в 68 случаях.

Таким образом, суммируя результаты проведенных исследований, можно заключить, что под влиянием вирусных вакцин кардиомиоциты иммунизированных животных приобретают способность к выработке веществ, которые влияют на их сократительную способность и электрофизиологическую активность.

Выделение, очистка этих субстанций, изучение условий их продукции, определение конкретных индукторов, а также получение антисывороток или моноклональных антител к ним откроют новые перспективы для ранней диагностики, лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и выяснения причин их развития.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Львов М. В. Дисс. канд., Ереван, 1971.
2. Филлит Г. В кн.: Клиническая иммунология сердца. 9 М., 1984.
3. Balkwill F. R., Burke F. Immunol. Today, 10, 9, 229, 1989.
4. Dodet B. Bio'atur., 44, 27—29, 31, 39, 1986.
5. Ferrer J. J., Benamtu W. P., Cheng L., Pawson B. A. Ann. Rept. Med. Chem., 19, Orlando e. a., 191, 1984.
6. Hermans H., Dillen C., Dijkmans R., Graau G., Billiau A. Lymphokine Res., 8, 3 329, 1989.
7. Malkovsky M., Sondet P. M., Strober W., Dalgleish A. G. Clin. and Exp. Immunol., 74, 2, 151, 1985.
8. Santes C., Fridman W. H. Rev. Pediat., 25, 6, 237, 1989.
9. Tsunoda R., Cormann N., Helnen E., Onosaki K., Coultie P., Akiyama Y. et al. Immunol. Lett., 22, 2, 129, 1989.

Поступило 19.XII 1990 г.