

Saet O.S., Sokol A.V., Rudenok P.V., Prygun D.P.

ЭКСПРЕССИЯ СУБСТАНЦИИ P, МЕТ-ЭНКЕФАЛИНА И БОМБЕЗИНА В ЗВЕЗДЧАТОМ ГАНГЛИИ ЧЕЛОВЕКА

Белорусский государственный медицинский университет,

г. Минск, Беларусь

Иммунореактивные к субстанции P (CP), мет-энкефалину (мет-ЭНК) и бомбезину (Бом) нервные клетки и нервные волокна выявлены в звездчатом ганглии человека методом непрямой иммуногистохимии. Звездчатый ганглий человека характеризуется нейропептидным разнообразием, которое выражается в присутствии гетерогенной популяции нейронов. Иммунореактивность к CP, мет-ЭНК и Бом в ганглионарных нейронах и нервных волокнах свидетельствует о нейротрансмиссивной гетерогенности симпатических узлов человека и вовлечении нейропептидов в регуляцию функций органов-мишеней.

Ключевые слова: человек, звездчатый ганглий, нейропептиды, экспрессия.

Saet O.S., Sokal A.V., Rudenok P.V., Pryhun D.P.

EXPRESSION OF SUBSTANCE P, MET-ENKEPHALIN AND BOMBESIN IN HUMAN STELLATE GANGLION

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Substance P (SP), met-Enkephalin (met-ENK) and Bombesin (Bom) immunoreactive nerve cells and nerve fibres were demonstrated in human stellate ganglion by indirect immunohistochemistry. The evidence for the presence of SP-, met-ENK- and Bom-Immunoreactivity in stellate ganglion suggests a neurotransmitter heterogeneity of human sympathetic ganglia and involvement of the neuropeptides in regulation of target organs function.

Key words: human, stellate ganglion, neuropeptides, expression.

Известно, что звездчатый ганглий (ЗГ) является основным источником, снабжающим постганглионарными симпатическими волокнами миокард и коронарные сосуды [1]. Наряду с классическими нейротрансмиссиверами – ацетилхолином и норадреналином, нейроны шейно-грудного узла содержат ряд нейромедиаторов пептидной природы, которые обладают широким спектром биологической активности в отношении сердечно-сосудистой системы [2, 3, 5]. Так, субстанция P (CP) оказывает отрицательные хронотропное и инотропное действия [6]. Мет-энкефалин (мет-ЭНК) обладает высокой анальгетической активностью и связан с феноменом адаптации сердца к гипоксии [11]. Ряд

авторов указывает на способность бомбезина (Бом) действовать в качестве эндогенного не опиоидного анальгетика и регулировать артериальное давление в эксперименте [8].

Однако в большинстве работ изучены распределение и функции нейропептидов в ганглиях автономной нервной системы млекопитающих животных. Данные об экспрессии трансммиттеров пептидной природы в симпатических узлах человека немногочисленны, а порой и противоречивы [4, 7, 10].

В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение иммунореактивности к субстанции P, мет-энкефалину и бомбезину в звездчатом узле человека.

Материал и методы. Непрямым иммуногистохимическим методом с применением антител к субстанции P, мет-энкефалину и бомбезину исследован аутопсийный материал звездчатых ганглиев 68 человек в возрасте от 45 до 69 лет. Фиксация материала проводилась в 2% растворе Замбони. После фиксации ганглии последовательно промывались в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4), 50% этиловом спирте, 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4), 20% растворе сахарозы. Серийные срезы толщиной 8–10 мкм были приготовлены из замороженных в 0,9% физиологическом растворе звездчатых узлов с помощью автоматического замораживающего микротомы фирмы «Leica» при температуре -22°C , смонтированы на предметных стеклах, покрытых 2%-м раствором желатина, и высушены при комнатной температуре ($18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут. Затем срезы дважды промывались в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 20 минут, после чего на них наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakoratts; X907). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. После удаления сыворотки срезы обрабатывались сыворотками, содержащими поликлональные антитела к SP (Milab, 1270, 1:400), мет-энкефалину (Affinity, ИНС 8601, 1:200) и бомбезину (Peninsula, N31030/L3, 1:200).

Для выявления мет-ЭНК был использован непрямой иммунофлуоресцентный метод. Срезы обрабатывались сыворотками, содержащими вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами (Cy3™-GAR IgG, 30254, Jackson) в разведении 1:100 и помещались на 2 часа в темную увлажненную камеру. После удаления сыворотки и двукратного промывания в фосфатном буфере (pH 7,4) срезы заключались в смесь глицерин/фосфатный буфер (3:1). Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе «AxioPhot» (Zeiss, Германия) с комбинациями фильтров для Cy3-индуцированной иммунофлуоресценции.

С целью выявления СР и Бом использовался иммунопероксидазный метод. На срезы наносилась козья сыворотка с вторичными антителами (GAR IgG, Dakopatts Z421) в разведении 1:100. Препараты помещались в инкубационную камеру, где сохранялись на протяжении 12 часов. После удаления вторичных антител на срезы наносился раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный комплекс (Dakopatts Z113, разведение 1:100). В качестве хромогена для выявления продукта реакции применялся диаминобензидин (Amerham). Оценка результатов исследования проводилась на светооптическом уровне при увеличении 400×. Продукт реакции определялся в виде мелкодисперсных зерен коричневого цвета.

Морфометрические исследования состояли в определении числа перикарионов с контурирующимися ядрами, демонстрирующих положительную реакцию к нейропептидам в пяти произвольно выбранных областях на каждом 5 или 10 срезе (в зависимости от размера образца биологического материала). В каждом случае анализировали не менее 10 полей зрения при увеличении 400×. Количество иммунореактивных к субстанции P, мет-энкефалину и бомбезину нейронов выражалось в процентах от общего числа нервных клеток. Вся популяция иммунореактивных к нейротрансмиттерам нейронов в зависимости от максимального диаметра перикариона была разделена на 3 группы: малые клетки (до 25 мкм), средние (25–35 мкм) и крупные (36 мкм и более).

Статистическая обработка результатов измерений осуществлялась в диалоговой системе «Statistika» (Version 10.0). Анализ достоверности различий проводился с помощью критерия Стьюдента.

В результате исследования установлено, что в звездчатом ганглии человека присутствует гетерогенная популяция нейронов, иммунореактивных (ИР) к субстанции Р, мет-энкефалину и бомбезину. Количество иммунореактивных к СР и Бом нервных клеток составляет $2,1 \pm 0,19\%$ и $3,6 \pm 1,07\%$ соответственно. Популяция мет-ЭНК ИР нейронов более многочисленна, однако не превышает $12,3 \pm 1,58\%$ от общего числа нервных клеток. Присутствие субстанции Р, мет-энкефалина и бомбезина в нейронах звездчатого узла обусловлено способностью СР, мет-ЭНК и Бом модулировать синаптическую передачу и обеспечивать, таким образом, более тонкие механизмы функционирования клеток.

Экспрессия субстанции Р, мет-энкефалина и бомбезина также была обнаружена в симпатических ганглиях ряда млекопитающим животных [7, 9].

Между тем, наши данные отличаются от результатов, полученных другими авторами при изучении симпатических узлов человека и млекопитающих животных. Данные литературы указывают на выраженные межвидовые различия экспрессии СР, мет-ЭНК и Бом в нейронах автономных узлов [1,4]. Подобные противоречия обусловлены тем, что цитохимические свойства нервных клеток значительно варьируют в симпатических ганглиях различных топографических уровней, а также у разных видов млекопитающих животных.

При анализе экспрессии СР, мет-ЭНК и Бом в звездчатом ганглии человека установлена морфофункциональная гетерогенность нервноклеточной популяции, иммунореактивной к СР, мет-ЭНК и Бом.

Иммунореактивными к субстанции Р, мет-энкефалину и бомбезину оказывались нейроны со средним (25–35 мкм) и крупным (36–60 мкм) диаметрами перикарионов. Такие нервные клетки могут представлять популяцию как эфферентных нейронов, которые имеют овальную форму тела и

аксоны, выходящие за пределы ганглия, так и сенсорных нейронов, афферентные отростки которых в составе ветвей шейно-грудного узла направляются к внутренним органам или конвергируют на эфферентных нейронах ганглия. Таким образом, выделяясь из нервной терминали, СР, мет-ЭНК и Бом могут оказывать модулирующее действие как на синаптическую передачу, так и на рецепторы иннервируемых органов.

В звездчатом ганглии человека также обнаруживаются одиночные СР-ИР ($9,6 \pm 0,79\%$) и Бом-ИР ($1,8 \pm 0,32\%$) мелкие клетки (15–24 мкм) с небольшими отростками, заполненными зернами продукта реакции. Не исключено, что эти клетки представляют популяцию малых интенсивно флуоресцирующих (МИФ) клеток первого типа. Кроме того, выявлены немногочисленные тонкие извитые СР-, мет-ЭНК- и БомИР нервные волокна. Они имели небольшие варикозные расширения и располагались на срезе ганглия продольными пучками или формировали корзинчатые структуры вокруг ганглионарных нейронов. Корзинчатые структуры содержат синаптические контакты, образованные аксонами преганглионарных нервных клеток, нейронов спинномозговых и симпатических ганглиев других топографических уровней или аксонными и дендритными коллатеральными другими нейронами собственного узла и МИФ-клеток.

Таким образом, звездчатый ганглий человека характеризуется нейропептидным разнообразием, которое выражается в наличии гетерогенной популяции нейронов, иммунореактивных к субстанции Р, мет-энкефалину и бомбезину. Экспрессия субстанции Р, мет-энкефалина и бомбезина в ганглионарных нейронах характеризует их способность обеспечивать регуляцию функций и компенсаторно-приспособительные реакции эффекторных органов и систем человека при постоянно изменяющихся условиях внешней и внутренней среды.

Литература

1. Ноздрачев, А.Д. Звездчатый ганглий: структура и функции / А.Д. Ноздрачев, М.М. Фатеев // Издательство Наука, 2002. – 240 с.

2. Осадчий О.Е. Действие регуляторных пептидов на электрофизиологические свойства сердца у человека / О.Е. Осадчий, С.Г. Канорский, В.М. Покровский и соавт. // Физиология чел. – 2001. – Т.27, №4. – С.61-66 с.
3. Стропус Р.А. Холинергическая и адренергическая иннервация сердца и ее изменения при сердечно-сосудистой патологии: Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 1982. - 35с.
4. Arciszewski, M.B. Neurochemical properties of the middle cervical ganglion in the sheep / M. B. Arciszewski, K. Wasowicz // Ann. Anat. – 2006. – Vol.188, №1. – P.75-83.
5. Ertl, G. Effects of neurotensin and neuropeptide Y on coronary circulation and myocardial function in dogs / G. Ertl, B. Bauer, H. Becker // Amer. J. Physiol. – 1993. – Vol.264. – P.1062-1068.
6. Guo Z. Up-regulation of substance P in the lungs during acute myocardial ischemia and infarction in rats / Z. Guo, X.P. Wang, J.P. Wang, R.H. Zhou, L.L. Wang, J. Wu // Regul. Pept. – 2010. – Vol.160, №1-3. – P.160-7.
7. Jiménez B. Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyl transferase, Met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat / B. Jiménez, E. Mora-Valladares, M.E. Zetina, M.A. Morales // Synapse. – 2002. – Vol.43, №3. – P.163-74.
8. Kimura O. Prevention of warm ischemic injury by neuropeptide bombesin in small bowel transplantation / Kimura O, Kinoshita H, Furukawa T, Higuchi K, Chujo S, Iwai N. // Transplant Proc. 2006. - Jul-Aug;38(6):1794-5.
9. Nasu T. Immunohistochemical study of the neuropeptides in the stellate ganglion of the water buffalo / T. Nasu, G. De Ocampo, H.A. Molina, S. Tateyama, M. Morimoto // Fukuoka Igaku Zasshi. – 2000. – Vol.91, №5. – P.116-22.
10. Sámano C. Choline acetyl transferase and neuropeptide immunoreactivities are colocalized in somata, but preferentially localized in distinct axon fibers and boutons of cat sympathetic preganglionic neurons / Sámano C, Zetina ME, Marín MA, Cifuentes F, Morales MA. // Synapse. – 2006. - Sep 15;60(4):295-306.
11. Schultz, J.E. Opioids and cardioprotection / Schultz, J.E., Gross, G.J. // Pharmacol. Ther. 2001. - 89, 123–137.