

О.С. Сает, В.В. Руденок

**ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МЕТ-ЭНКЕФАЛИНА В ЗВЕЗДЧАТОМ
ГАНГЛИИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА**
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Методом непрямой иммуногистохимии исследована экспрессия мет-энкефалина (мет-ЭНК) в звездчатом ганглии человека в условиях острой ишемии миокарда. Показано значительное увеличение экспрессии мет-ЭНК в нейронах и волокнах исследованных узлов при остром инфаркте миокарда. Гипоксия, которая сопровождает острый инфаркт миокарда, является основным индуктором синтеза мет-ЭНК в нейронах звездчатого узла человека.

Ключевые слова: *мет-энкефалин, экспрессия, звездчатый узел, инфаркт миокарда.*

O.S. Saet, V.V. Roudenok

***UP-REGULATION OF MET-ENKEPHALIN EXPRESSION IN HUMAN STELLATE
GANGLIA AFTER ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION***

By the method of indirect immunohistochemistry the distribution patterns of met-enkephalin (met-ENK) expression in human stellate ganglia after acute myocardial infarction were investigated. Up regulation of met-ENK expression was revealed. We suggest that hypoxia which accompanies acute myocardial infarction is the main inducing factor for the synthesis of met-ENK. This is supposed to be a compensatory-adaptive reaction that helps to limit an ischemic injury of the heart.

Key words: met-enkephalin, expression, ganglion stellatum, myocardial infarction.

Звездчатый ганглий является основным источником, снабжающим постганглионарными симпатическими волокнами сердце и коронарные сосуды. Исследования последних десятилетий показали, что нейроны и отростки этого узла содержат большое число нейромедиаторов пептидной природы, которые обладают широким спектром биологической активности, в том числе в отношении сердечнососудистой системы. Они способны не только модулировать синоптическую передачу, обеспечивая более тонкие механизмы функционирования нейронов, но и значительно изменять течение физиологических и патологических процессов в иннервируемых органах. Одним из известных нейропептидов является представитель эндогенных лигандов опиоидных рецепторов мет-энкефалин (мет-ЭНК). Исследованию физиологических свойств этого нейропептида посвящено большое число работ. Так, среди эффектов мет-ЭНК описаны высокая анальгетическая активность [6,10,15], антистрессорное действие [1], инотропный [8] и хронотропный эффекты [2]. Ряд авторов указывает на связь эндогенных опиатов с феноменом адаптации сердца к гипоксии [3,20,24]. Вместе с тем, вопрос об особенностях распределения мет-ЭНК в звездчатом ганглии человека остается открытым, поскольку подавляющее большинство исследований проведено на животных и *in vitro*. Более того, в литературе практически отсутствуют данные о связи острой и хронической гипоксии с уровнем мет-ЭНК в симпатических ганглиях человека. Целью настоящей работы является установление экспрессии мет-ЭНК в звездчатом узле при остром инфаркте миокарда.

Материалы и методы. Методом непрямой иммуногистохимии исследованы звездчатые ганглии девяти человек умерших от острого инфаркта миокарда в возрасте от 45 до 59 лет. В качестве контроля использовались узлы пяти человек того же возраста, не страдавших сердечнососудистыми заболеваниями. Все образцы получены и фиксированы в течение 10 часов после смерти. Фиксация звездчатого ганглия проводилась в 2% растворе Замбони, включающем в свой состав параформальдегид, пикриновую кислоту, одно- и двухзамещенный фосфаты натрия (рН 7.4). После фиксации фрагменты ганглия последовательно промывались в 0.1М фосфатном буфере (рН 7.4), 50% этиловом спирте, 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), 20% растворе сахарозы. В этом растворе образцы находились в течение 12 часов при температуре 4 °С. Серийные срезы толщиной 8-10мкм были приготовлены из замороженных в 0,9% физиологическом растворе фрагментов звездчатого ганглия с помощью автоматического замораживающего микротомы фирмы «Leica» при температуре -22 °С, смонтированы на покрытых желатином (2% раствор) предметных стеклах и высушены при комнатной температуре (18-20 °С) в течение 30 минут. Затем препараты были помещены в морозильную камеру, где сохранялись при температуре -78 °С. Перед проведением иммуногистохимических реакций предметные стекла

извлекались из холодильника и подвергались просушке в открытом помещении при температуре 18-20 °С в течение 30 минут. Затем срезы дважды промывались в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) в течение 20 минут, после чего на них наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakoratts; Х907). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. Затем нормальная козья сыворотка была удалена, и срезы были обработаны сывороткой, содержащей поликлональные антитела к мет-ЭНК (ANTI-Met-ENK, 1:200, IHC 8601, Peninsula). Извлеченные из темной увлажненной камеры по истечении срока инкубации препараты дважды по 10 минут промывались в кюветках с фосфатным буфером (рН 7.4). Далее срезы обрабатывались сыворотками, содержащими вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами: Су3 (Су3™-GARlgG, 30254, Jackson) в разведении 1:100. Затем препараты помещались на 2 часа в темную увлажненную камеру. После удаления сыворотки и двукратного промывания в фосфатном буфере (рН 7.4) срезы заключались в смесь глицерин/фосфатный буфер (3:1). Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе Аxiophot ("Zeiss", Германия) с комбинациями фильтров для Су3 индуцированной иммунофлуоресценции. Интенсивность иммуногистохимической реакции определялась как слабая, средняя и сильная.

Морфометрические исследования состояли в определении числа перикарионов с контурирующимися ядрами, демонстрирующих положительную реакцию к нейропептиду в пяти произвольно выбранных областях (подкапсулярные зоны, центр, полюса симпатического узла) на каждом 10 срезе. Полученные числовые данные выражали в процентах. Для оценки результатов использовался анализатор изображений «Bioscan-NT» и программы, разработанные в лаборатории компьютерных технологий ЦНИЛ Белорусского государственного медицинского университета. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» (Version 6-index, Statsoft Inc.). Достоверность различий оценивали при помощи *t* - критерия Стьюдента - Фишера. Различия рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В исследованных звездчатых ганглиях контрольной группы определялась небольшая популяция (1,5 %) иммунопозитивных к мет-ЭНК нейронов (рис 1). Как правило, нервные клетки имели овальную форму и небольшую величину перикарионов. При этом иммунопозитивные нейроны на срезах ганглиев располагались неравномерно, без четких закономерностей в локализации. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценивалась как слабая или средняя. Также определялись единичные мет-ЭНК-иммунореактивные тонкие извитые нервные волокна с мелкими варикозными расширениями. Однако такие волокна выявлялись не на каждом срезе.

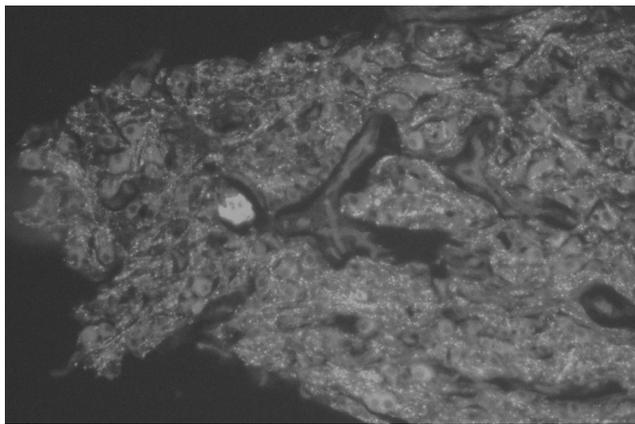


Рис. 1. Единичный иммунореактивный к мет-ЭНК нейрон в подкапсулярной области контрольного звездчатого ганглия человека (непрямой иммунофлуоресцентный метод, ув.200)

При остром инфаркте миокарда выявлено увеличение экспрессии мет-энкефалина (36,1 %) в нервных клетках звездчатого ганглия человека. Нейроны имели округлую, грушевидную или полигональную форму перикарионов и располагались в различных областях ганглия. Мет-ЭНК-иммунореактивные нервные клетки нередко формировали кластеры, в состав которых входило до трех – четырех иммунопозитивных нейронов (рис 2). Отмечалось увеличение количества мет-ЭНК-иммунореактивных нервных волокон с варикозными расширениями. Источником их происхождения являлись также и мет-ЭНК-иммунопозитивные перикарионы. Волокна формировали корзинчатые структуры, оплетая мет-ЭНК-иммунонегативные нейроны. Интенсивность иммуногистохимической реакции варьировала в различных по величине перикариона нейронах. Наибольшую интенсивность иммунофлуоресценции демонстрировали крупные и средние мет-ЭНК-иммунореактивные нейроны.

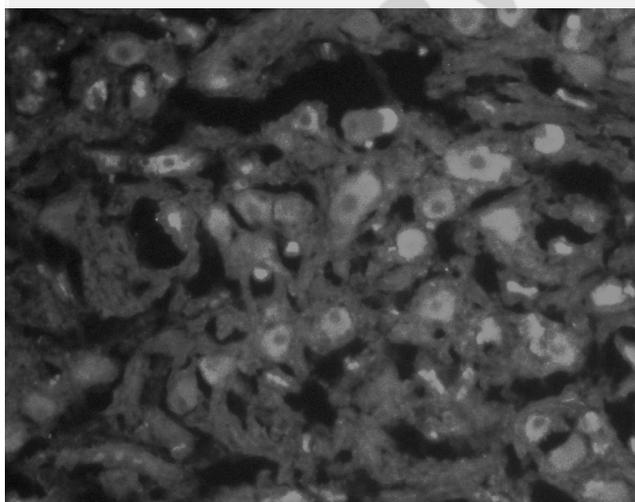


Рис. 2. Мет-ЭНК иммунореактивные нервные клетки и волокна в звездчатом ганглии человека после острого инфаркта миокарда (непрямой иммунофлуоресцентный метод, ув.400)

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют увеличение экспрессии мет-ЭНК в звездчатом ганглии человека при остром инфаркте миокарда. Эти данные согласуются с результатами выявления экспрессии других нейропептидов в условиях острой ишемии миокарда. Так, показано резкое увеличение экспрессии вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в нервных клетках и волокнах звездчатого ганглия человека под влиянием гипоксии [17]. Уровень мРНК галанина в нейронах звездчатого ганглия также значительно возрастает вслед за ишемией-реперфузией [5]. Многие работы посвящены исследованию связи гипоксии с концентрацией регуляторных пептидов в других тканях. Описано увеличение уровня субстанции П в миокарде, а также повышение экспрессии мРНК этого пептида в спинномозговых узлах в условиях окклюзии коронарной артерии у белой крысы [4]. У человека отмечается значительное повышение концентрации нейропептида У в плазме крови спустя три дня после острого инфаркта миокарда [13]. В ряде исследований показана связь острой ишемии миокарда с уровнем мет-ЭНК в плазме крови и сердечной ткани. Так, у крыс в зоне ишемии миокарда происходит четырехкратное увеличение содержания мет-ЭНК через 15 минут после перевязки венечной артерии, что связано с усилением синтеза мет-ЭНК и его предшественников в ткани миокарда, поскольку поступление опиоида с током крови исключено, в связи с лигированием венечной артерии [11]. Не исключен и антероградный транспорт мет-ЭНК по аксонам звездчатого ганглия. Более того, при изучении гистологической структуры шейно-грудного узла человека показано, что присутствие фиброза миокарда, маркера предшествующей ишемии, коррелирует с увеличением числа нейронов левого звездчатого ганглия. По мнению авторов, это является индикатором гиперсимпатической стимуляции миокарда, которая в свою очередь связана с интенсивной регенерацией и спрутингом [21]. В таких условиях поступление мет-ЭНК, содержание которого возрастает в нейронах и волокнах звездчатого ганглия, в миокард становится еще более вероятным. Как показывают данные литературы, физиологическая роль мет-ЭНК при острой ишемии миокарда напрямую связана с феноменом адаптации сердца к гипоксии. Так, в экспериментальных исследованиях на крысах, кроликах и других млекопитающих показано, что мет-ЭНК способен уменьшать зону некроза миокарда *in vivo* [7, 23]. Связь адаптации сердца с активацией опиатных рецепторов показана также в экспериментах с введением морфина. При внутривенном его введении перед экспериментальной коронарной окклюзией с последующей реперфузией у крыс размеры некроза достоверно уменьшаются [18]. Более того, протективный эффект морфина в отношении ишемии-реперфузии был показан и у человека [16]. Как известно, опиаты также способны уменьшать выброс норадреналина симпатическими нервными окончаниями миокарда [22,9], ограничивая тем самым гипериннервацию миокарда, которая ведет к желудочковым аритмиям и фибрилляции предсердий [12,19].

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что гипоксия, которая сопровождается острым



инфаркт миокарда, является фактором, индуцирующим синтез мет-энкефалина в нейронах звездчатого ганглия человека. Учитывая биологическую роль и кардиотропные эффекты мет-ЭНК, применение аналогов нейрпептида в клинической практике может существенно увеличить эффективность терапии острого инфаркта миокарда.

Литература

1. *Лишманов, Ю.Б.* Роль опиоидной системы в адаптации организма и защите сердца при стрессе / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Т. В. Ласукова // Успехи физиол. наук, 1997. – № 28(1). – С.75–96.
2. *Clô, C* [et al.]. Reduced mechanical activity of perfused rat heart following morphine or enkephalin peptides administration / C. Clô [et al.] // Life Sci., 1985. – Vol. 37. – P. 1327–1333.
3. *Gross, G.J.* [et al.]. Evidence for a role of opioids in epoxyeicosatrienoic acid-induced cardioprotection in rat hearts/ G.J. Gross [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2010. – Vol.298. – H. 2201–2207.
4. *Guo, Z.* [et al.]. Coronary artery occlusion alters expression of substance P and its mRNA in spinal dorsal horn in rats / Z. Guo [et al.] // Neuroscience, 2007. – Vol.145(№2). – P.669–675.
5. *Habecker, B.A.* [et al.]. Myocardial infarction stimulates galanin expression in cardiac sympathetic neurons / B.A. Habecker [et al.] // Neuropeptides, 2005. – Vol.39(№2). – P.89–95.
6. *Herz, A., Millan, M.J.* Opioids and opioid receptors mediating antinociception at various levels of the neuraxis / A. Herz, M.J. Millan // Physiol. Bohemoslov., 1990. – Vol.39. – P. 395–401.
7. *Kuzume, K.* [et al.]. Sustained exogenous administration of Met5-enkephalin protects against infarction in vivo / K. Kuzume [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2003. – Vol. 285. – H2463–2470.
8. *Laurent, S.* Enkephalins have a direct positive inotropic effect on cultured cardiac myocytes / S. Laurent, J.D. Marsh, T.W. Smith // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1985. – Vol.82. – P. 5930–5934.
9. *Ledda, F., Mantelli, L.* Possible presynaptic inhibitory effect of etorphine on sympathetic nerve terminals of guinea-pig heart / F. Ledda, L. Mantelli // Eur. J. Pharmacol., 1982. – Vol. 85 – P.247–250.
10. *Malick, J.B., Goldstein, J.M.* Analgesic activity of enkephalins following intracerebral administration in the rat / J.B. Malick, J.M. Goldstein // Life Sci., 1977. – Vol. 20. – P.827–32.
11. *Maslov, L.N., Lishmanov, Y.B.* Changes in opioid peptide level in the heart and blood plasma during acute myocardial ischemia complicated by ventricular fibrillation / L.N. Maslov, Y.B. Lishmanov // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1995 – Vol. 22. – P. 812–816.
12. *Miyauchi, Y.* [et al.]. Altered atrial electrical restitution and heterogeneous sympathetic hyperinnervation in hearts with chronic left ventricular myocardial infarction: implications for atrial fibrillation / Y. Miyauchi [et al.] // Circulation, 2003. – Vol. 108. – P. 360–366.
13. *Omland, T.* Plasma neuropeptide Y levels in the acute and early convalescent phase after myocardial infarction / T. Omland, K. Opstad, K. Dickstein // Am. Heart. J., 1994. – Vol.127. – P.774–779.
14. *Parlapiano, C.* [et al.]. Met-enkephalin levels during PTCA-induced myocardial ischemia / C. Parlapiano [et al.] // Peptides, 2001. – Vol. 22. – P.1181–1182.
15. *Przewlocki, R., Przewlocka, B.* Opioids in chronic pain / R. Przewlocki, B. Przewlocka // Eur. J. Pharmacol., 2001. – Vol. 429. – P. 79–91.
16. *Rentoukas, I.* [et al.]. Cardioprotective role of remote ischemic preconditioning in primary percutaneous coronary intervention: enhancement by opioid action / I. Rentoukas [et al.] // JACC Cardiovasc. Interv., 2010. – Vol.3. – P.49–55.
17. *Roudenok, V.* [et al.]. Expression of vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin gene-related peptide in human stellate ganglia after acute myocardial infarction / V. Roudenok [et al.] // Ann. Anat., 2001. – Vol. 183. – P. 341–344.
18. *Schultz, J.E.J.* Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. / J.E.J. Schultz, A.K. Hsu, G.J. Gross // Circ.Res., 1996. – Vol. 78. – P.1100–1104.
19. *Swissa, M.* [et al.]. Canine model of Paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia / M. Swissa [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2005. – Vol.289. – P. 1851–1857.
20. *Tomai, F.* [et al.]. Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans / F. Tomai [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol., 1999. – Vol. 33. – P. 1863–1869.
21. *Wood, A.* Cardiovascular disease and its association with histological changes of the left stellate ganglion / A. Wood, S. Docimo, D.E. Elkowitz // Clin. Med. Insights Pathol., 2010. - Vol. 3. – P. 19–24.
22. *Xiao, R.-P.* [et al.]. Cardioprotective role of remote ischemic preconditioning in primary percutaneous coronary intervention: enhancement by opioid action / R.-P. Xiao [et al.] // Am. J. Physiol., 1997. – Vol. 272. – H. 797–805.
23. *Zatta, A.J.* [et al.]. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation / A.J. Zatta [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2008. – Vol. 294. – H1444–1451.
24. *Zhang, S.Z.* [et al.]. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning / S.Z. Zhang [et al.] // Anesthesiology, 2006. – Vol.105. – P.550–556.