

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ К СУБСТАНЦИИ П И БОМБЕЗИНУ В ЗВЕЗДЧАТОМ ГАНГЛИИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

О.С. Саен, В.В. Руденок, А.В. Сокол

Белорусский государственный медицинский университет

Введение. Звездчатый ганглий является главным источником симпатической эфферентной иннервации сердца человека. Наряду с основными медиаторами – ацетилхолином и норадреналином, его нейроны и волокна содержат различные нейротрансмиттеры пептидной природы, которые обладают широким спектром биологической активности, в том числе в отношении сердечно-сосудистой системы. Субстанция П (СП) — нейропептид семейства тахикининов, состоящий из 11 аминокислотных остатков [3]. Как показывают данные морфофункциональных и фармакологических исследований, СП выполняет многочисленные регуляторные функции. Так, среди эффектов этого нейропептида описаны понижение артериального давления, отрицательные хронотропное и инотропное действия, повышение сосудистой проницаемости и вазодилатация [4]. Бомбесин состоит из 14 аминокислотных остатков и относится к группе регуляторных пептидов с нейротрансмиттерными и нейромодуляторными функциями [2]. Он способен действовать в качестве эндогенного неопиоидного анальгетика [9], повышать частоту сердечных сокращений и оказывать вазопрессорный эффект [1].

Методом непрямой иммуногистохимии изучена экспрессия СП и бомбесина в вегетативных ганглиях ряда млекопитающих животных. Между тем, данные об экспрессии трансмисмиттеров пептидной природы в шейно-грудном узле человека фрагментарны, а порой и противоречивы. Более того, в литературе практически отсутствуют сведения о связи острой и хронической гипоксии с уровнем СП и бомбесина в симпатических ганглиях человека.

Цель исследования: установить экспрессию субстанции П и бомбесина в звездчатом ганглии человека при остром инфаркте миокарда.

Задачи исследования: изучить иммунореактивность к субстанции П и бомбесину в звездчатом ганглии человека в норме и при остром инфаркте миокарда.

Определить различия между уровнями иммунореактивности к субстанции П и бомбесину в нейронах и волокнах звездчатого узла человека в норме и при остром инфаркте миокарда.

Установить закономерности экспрессии субстанции П и бомбесина в условиях острой ишемии миокарда.

Материалы и методы. Изучены звездчатые ганглии одиннадцати человек умерших от острого инфаркта миокарда в возрасте от 45 до 59 лет. Для контроля использовались узлы пяти человек того же возраста, не страдавших сердечно-сосудистыми заболеваниями. Все образцы получены и фиксированы в течение 10 ч после смерти. Для выявления субстанции П и бомбесина был использован непрямой иммунопероксидазный метод, который основан на применении первичных (моно- или поликлональных) антител, специфичных к исследуемым антигенам. Антитела образуют с антигенами иммунные комплексы, которые обнаруживаются с помощью вторичных антител, связанных пероксидазно-антипероксидазным комплексом. Характеристика первичных антител представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика первичных антител

Антитела	Тип	Разведение	Код	Производитель
анти-SP	поликлональные	1:400	1270	Peninsula
анти-BOMBESIN	поликлональные	1:200	N31030/L3	Peninsula

Морфометрические исследования состояли в определении числа перикарионов с контурирующимися ядрами, демонстрирующих положительную реакцию к нейропептидам в пяти произвольно выбранных областях (подкапсулярные зоны, центр, полюса звездчатого узла) на каждом 10 срезе. Для оценки результатов использовался анализатор изображений «Bioscan-NT». Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ

«STATISTICA» (Version 10, Statsoft Inc.). Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента–Фишера ($P < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. В исследованных звездчатых ганглиях контрольной группы определялись единичные нейроны иммунореактивные (ИР) к СП и бомбезину. Небольшая популяция СП-ИР нервных клеток (до 2,1%) была представлена овальными или полигональными перикарионами, которые располагались в центральных областях среза узла. Продукт иммуногистохимической реакции в виде зерен коричневого цвета был распределен в цитоплазме равномерно или концентрировался у одного из полюсов нервной клетки. Интенсивность иммунореактивности оценивалась как слабая и средняя и не зависела от размерного признака нейронов – в одинаковой степени иммунореактивность проявляли крупные, средние и мелкие клетки. Отдельные СП-ИР нейроны имели небольшой протяженности отростки, заполненные зернами продукта реакции. Также были обнаружены немногочисленные тонкие извитые СП-ИР нервные волокна с мелкими варикозными расширениями. Нередко СП-иммунореактивные нервные волокна формировали корзинчатые структуры вокруг СП-иммунонегативных нервных клеток.

Бомбезин-ИР нейроны составляли 1,1% по отношению к общей нервно-клеточной популяции звездчатого ганглия контрольной группы. Бомбезин-иммунореактивные нейроны имели округлую, овальную или неправильную форму перикарионов и располагались на срезах ганглиев неравномерно, без четких закономерностей в локализации. Продукт реакции в виде мелкодисперсных зерен был равномерно распределен в цитоплазме или концентрировался в околоядерной зоне. Наибольшую интенсивность иммунореактивности к бомбезину проявляли крупные и средние нейроны. Между бомбезин-ИР нервными клетками прослеживались немногочисленные иммунореактивные к бомбезину нервные волокна с варикозными утолщениями, источником происхождения которых могут быть нервные клетки шейно-грудного узла.

При остром инфаркте миокарда в звездчатом ганглии человека определялось достоверное повышение экспрессия СП и бомбезина. Вместе с тем, уровень иммунореактивности нейропептидов, а также их распределение значительно варьировали в различных популяциях нейронов. Так, для СП была характерна интенсивная ядерная экспрессия. Иммунореактивные к СП нейроны составляли 29,8% от общей нервно-клеточной популяции и располагались как в центральных, так и периферических областях среза ганглия. Нередко, СП-ИР нейроны формировали кластеры (до 4-5 клеток), которые находились вблизи кровеносных сосудов и имели небольшие размеры перикарионов. Вероятно, такие нервно-клеточные группы представляют популяцию малых интенсивно флуоресцирующих клеток (МИФ-клеток) второго типа, которые способны выделять нейромедиатор непосредственно в капиллярную сеть ганглия, оказывая при этом как местный, так и дистантный эффекты. Интенсивная иммунореактивность отмечалась также в СП-ИР нервных волокнах, которые формировали перинеурональные сети вокруг СП-ИР нейронов.

При остром инфаркте миокарда экспрессия бомбезина была обнаружена в 38,4% нейронов шейно-грудного узла человека. Форма клеточного тела бомбезин-ИР нервных клеток была чаще всего округлая или овальная, реже выявлялись нейроны с неправильной, полигональной формой перикарионов. Интенсивность иммуногистохимической реакции варьировала в различных по величине нейронах: наиболее интенсивную экспрессию демонстрировали крупные и средние бомбезин-ИР клетки. Отмечалось увеличение количества бомбезин-ИР нервных волокон с варикозными расширениями. Источником их происхождения являлись также и бомбезин-иммунореактивные перикарионы.

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют повышение экспрессии СП и бомбезина в звездчатом ганглии человека при остром инфаркте миокарда. Эти данные согласуются с результатами выявления иммунореактивности к другим нейропептидам в условиях острой ишемии. Так, установлено резкое увеличение экспрессии вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в нервных клетках и волокнах звездчатого ганглия человека при остром инфаркте миокарда [10]. Ряд авторов указывает на связь гипоксии с изменением концентрации регуляторных пептидов в других тканях. Описано возрастание иммунореактивности к субстанции П в миокарде, а также повышение экспрессии мРНК этого пептида в нейронах спинномозговых узлов в условиях окклюзии коронарной артерии у белой крысы [6]. Концентрация бомбезина также достоверно увеличивается в плазме крови при ишемии/реперфузии [8], при этом введение специфического антагониста рецепторов бомбезина приводит к значительно более тяжелым

ишемическим повреждениям в эксперименте [7]. Таким образом, были получены доказательства протективной роли эндогенного бомбесина в условиях ишемии *in vivo*. Вопрос о роли субстанции П в условиях ишемии миокарда остается открытым. Так, одни авторы указывают на защитную роль этого нейропептида при ишемическом повреждении кардиомиоцитов [11], в то время как другие данные свидетельствуют о вовлечении СП в постишемическую дисфункцию миокарда [5].

Выводы. В звездчатом ганглии человека контрольной группы определяется немногочисленная гетерогенная популяция нейронов демонстрирующих иммунореактивность к СП и бомбесину.

При остром инфаркте миокарда в нейронах и волокнах звездчатого ганглия человека отмечается достоверное повышение экспрессии СП и бомбесина. Неодинаковые проявления иммунореактивности к субстанции П и бомбесину могут быть связаны с различной степенью их вовлечения в регуляторные процессы. Возрастание иммунореактивности к СП и бомбесину в симпатических ганглионарных нейронах при остром инфаркте миокарда может свидетельствовать об их повышенной синтетической и синаптической активности в условиях функционального напряжения сердца.

UP-REGULATION OF SUBSTANCE P AND BOMBESIN IN HUMAN STELLATE GANGLIA AFTER ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

O.S. Saet, V.V. Rudenok, A.V. Sokol

By the method of indirect immunohistochemistry the distribution patterns of substance P (SP) and bombesin expression in human stellate ganglia after acute myocardial infarction were investigated. Up-regulation of both SP and bombesin-immunoreactivities was revealed. It was concluded that hypoxia and myocardial ischemia following acute myocardial infarction are the main inducing factor for the synthesis of SP and bombesin. The increase of SP and bombesin may provide regulatory and trophic support to the ischemic myocardium.

Литература.

1. Bayorh M.A., Feuerstein G: Bombesin and substance P modulate peripheral sympathetic and cardiovascular activity. *Peptides*, 1985, 1, 115–120.
2. Brady S., Siegel G., Albers R.W., Price D. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* – Elsevier. 2005. 992p.
3. Chang M.M., Leeman S.E., Niall H.D. Amino-acid sequence of substance P. *Nat. New. Biol.* 1971; 232 (29): 86-87.
4. Chiao H., Caldwell R.W. Local cardiac effects of substance P: roles of acetylcholine and noradrenaline. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 283-288.
5. Chiao H., Caldwell R.W. The role of substance P in myocardial dysfunction during ischemia and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1996; 353 (4): 400-407.
6. Guo Z., Niu Y.L., Zhang J.W., Yao T.P. Coronary artery occlusion alters expression of substance P and its mRNA in spinal dorsal horn in rats. *Neuroscience*, 2007; 145(2): 669-675.
7. Heuser M., Pfaar O., Gralla O., Gröne H.J., Nustede R., Post S.. Impact of gastrin-releasing peptide on intestinal microcirculation after ischemia-reperfusion in rats. *Digestion.* 2000; 61(3):172-80.
8. Meleagros L., Ghatel M.A., Bloom S.R. Release of vasodilator, but not vasoconstrictor, neuropeptides and of enteroglucagon by intestinal ischaemia/reperfusion in the rat. *Gut* 1994; 35: 1701-1706.
9. Raevsкая O.S., Fedoseeva O.V., Kalyuzhnyi L.V. Selectivity of analgesic effects of angiotensin and bombesin against dental and cutaneous nociceptive stimuli. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* October 1988; 106 (4): 1441-1443.
10. Roudenok V., Gutjar L., Antipova V., Rogov Y. Expression of vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin gene-related peptide in human stellate ganglia after acute myocardial infarction. *Ann. Anat.* 2001; 183: 341-344.
11. Ustinova E.E., Bergren D., Schultz H.D. Neuropeptide depletion impairs postischemic recovery of the isolated rat heart: role of substance P. *Cardiovasc. Res.* 1995; 30 (1): 55-63.