

Саєт О. С., Сокол А. В., Пригун Д. П., Руденюк П. В.

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ
К МЕТ-ЭНКЕФАЛИНУ В СИМПАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ЧЕЛОВЕКА**

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,

Мет-энкефалин — один из многих нейротрансмиттеров пептидной природы, который, наряду с другими нейропептидами, распространен в симпатических преганглионарных терминалях и ганглионарных нейронах [1–5]. Выполняя

котрансмиттерные функции, мет-энкефалин (мет-ЭНК) наряду с классическими нейротрансмиттерами вегетативной нервной системы — ацетилхолином и норадреналином, участвует в регуляции кровотока и потоотделения [2, 3]. Однако большинство работ касается распределения мет-ЭНК в симпатических узлах млекопитающих животных [4, 5, 7], исследования экспрессии мет-энкефалина в паравертебральных ганглиях человека единичны и, как правило, выполнены на узлах человека, полученных при хирургической симпатэктомии [2, 3].

Цель исследования: изучить иммунореактивность к мет-энкефалину в шейно-грудных узлах новорожденных и взрослого человека.

Материал и методы. Методом непрямого иммуногистохимии исследованы полученные при аутопсии шейно-грудные узлы 11 новорожденных (1–4 суток) и 9 взрослых в возрасте 45–59 лет. Фиксация материала осуществлялась в растворе Замбони на протяжении 1–4 дней при температуре +4 °С. После фиксации ганглии были последовательно промывались в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), 50° этиловом спирте, 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), 20 % растворе сахарозы. В последнем растворе образцы ткани находились в течение 12 часов при t +4 °С. Затем были приготовлены криостатные серийные срезы толщиной 8–10 μm, которые монтировались на обработанных хром-желатином предметных стеклах. После просушки в течение 30–60 минут при комнатной температуре и промывки в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) на срезы был нанесен 10 % раствор нормальной козьей сыворотки (Dakopatts; X 907). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. После удаления нормальной козьей сыворотки на срезы наносилась сыворотка, содержащая поликлональные антитела против мет-энкефалина (Peninsula 61008) в разведении 1:200, и препараты основа были оставлены в темной увлажненной камере на 12 часов. Затем, после промывки фосфатным буфером (рН 7,4), они обрабатывались конъюгированной с флуорофором антисывороткой (Cy 3TM — conjugated Affinity Pure Goat Anti-Rabbit Ig G, Jackson Immuno Research Laboratories, N 30254) в разведении 1:100 и помещались на 2 часа в темную увлажненную камеру. После удаления антисыворотки и промывания в фосфатном буфере (рН 7,4) срезы заключались в смесь глицерин/фосфатный буфер (3:1) под покровные стекла. В качестве контроля реакция проведена без первичных антител к мет-энкефалину. Анализ результатов осуществлен с использованием флуоресцентного микроскопа (Axioophott, Zeiss).

Результаты и обсуждение. В шейно-грудных узлах новорожденных были выявлены мет-ЭНК иммунореактивные нервные клетки, которые составляли 26 % от общего числа нервно-клеточной популяции ганглиев. Как правило, они имели незначительные размеры перикарионов и располагались одиночно или небольшими группами, чаще в центральных областях симпатических ганглиев. Отмечалась гетерогенность реакции — сильную иммунофлуоресценцию обнаруживали клетки с более мелкими размерами перикарионов. Среди нервных клеток отмечались также тонкие нервные волокна.

В исследованных симпатических узлах взрослого человека выявлены иммунопозитивные к мет-энкефалину нервные волокна, которые формировали сети или располагались на срезах параллельными пучками, отдельные из них демон-

стрировали варикозные утолщения. Следует отметить неравномерное распределение иммунореактивных к мет-ЭНК нервных волокон в симпатических ганглиях. На отдельных срезах эти структуры не наблюдались. Кроме того, вокруг некоторых ганглионарных нейронов мет-ЭНК иммунореактивные волокна с варикозными утолщениями формировали корзинчатые образования.

Иммунореактивные к мет-энкефалину нервные клетки в шейно-грудных узлах взрослого человека встречались реже (12,3 %) по сравнению с мет-ЭНК-ИР нейронами в симпатических ганглиях плодов.

Как правило, эти нейроны среднего или крупного размера располагались одиночно, без четких закономерностей в локализации. Некоторые из них обнаруживали короткие отростки. Иногда отмечались мет-ЭНК — иммунореактивные корзинчатые формирования вокруг позитивных к мет-энкефалину нейронов. На срезах узлов также выявлялись немногочисленные иммунореактивные к мет-энкефалину клетки с небольшими размерами клеточного тела представляющие популяцию малых интенсивно флуоресцирующих или МИФ-клеток, которые располагались небольшими группами (до 2–3 клеток) или одиночно вблизи кровеносных сосудов. Распределение иммунореактивных к мет-энкефалину волокон в симпатических узлах человека аналогично таковым у отдельных видов млекопитающих животных [1, 4, 8]. Однако, у млекопитающих животных, в частности грызунов, популяция иммунореактивных к мет-энкефалину нервных клеток значительно больше [8]. Результаты наших исследований, касающиеся распределения иммунореактивных к мет-ЭНК нервных волокон и МИФ-клеток в паравертебральных ганглиях человека согласуются с немногочисленными литературными данными [2, 3]. Между тем, в настоящей работе, в отличие от результатов других исследований, показана динамика изменений количества иммунореактивных к мет-энкефалину структур в симпатических узлах человека в онтогенезе. Выявление одиночных мет-ЭНК-иммунореактивных нервных клеток и меньшей популяции МИФ-клеток в настоящем исследовании объясняется спецификой материала — результаты других работ основывались на исследовании ганглиев полученных методом хирургической симпатэктомии от пациентов с нарушениями периферического кровотока [2, 3]. Эти иммунореактивные к мет-ЭНК клетки принадлежат ко второму типу МИФ — клеток, которые участвуют в регуляции кровотока [2, 6]. Не исключено, что иммунореактивные к мет-энкефалину ганглионарные нейроны относятся к холинергической популяции нервных клеток симпатических узлов, которые участвуют в регуляции пототделения [2], а их отростки, наряду с отростками м-ЭНК-иммунореактивных преганглионарных нейронов, составляют основу меченых по мет-энкефалину волокон внутри ганглиев [3]. Наличие большей популяции иммунореактивных к мет-энкефалину нервных клеток в симпатических узлах новорожденных объясняется не только его нейротрансмиттерными свойствами, но и индукторным и трофическим эффектами мет-энкефалина в дифференцирующихся ганглионарных нервных клетках, о чем также свидетельствуют малые размеры иммунореактивных к мет-ЭНК нейронов. Подобные изменения в распределении иммунореактивных к другим нейропептидам нервных клеток и волокон были выявлены нами ранее [6, 7].

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о нейротрансмиттерной гетерогенности симпатических узлов человека, в которых, наряду с классическими нейротрансмиттерами — норадреналином и ацетилхолином, выявляется нейротрансмиттер пептидной природы — мет-энкефалин. Более того, симпатические узлы человека обладают свойством нейротрансмиттерной пластичности, выражающейся в изменении экспрессии мет-ЭНК в ганглионарных нейронах в различные периоды онтогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Met5-enkephalin-Arg6-Phe7- and Met5-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerve fibers and neurons in the superior cervical ganglion of the rat* / O. Häppölä [et al.] // *Neuroscience*. 1987. Vol. 21. P. 283–95.
2. *Localization of [Leu⁵]-enkephalin-like immunoreactivity in nerve terminals in human paravertebral sympathetic ganglia* / A. Hervonen [et al.] // *Neuroscience*. 1981. Vol. 6, N 3. P. 323–330.
3. *Järvi, R. Localization of neuropeptide Y in human sympathetic ganglia : correlation with met-enkephalin, tyrosine hydroxylase and acetylcholinesterase* / R. Järvi, Pelto-Huikko // *Histochem J*. 1990. Vol. 22. P. 87–94.
4. *Radioimmunoassay and characterization of enkephalins in rat tissues* / R. J. Miller [et al.] // *J. Biol. Chem*. 1978. Vol. 2. P. 253.
5. *Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons* / V. M. Pickel [et al.] // *Brain Res*. 1979. Vol. 160. P. 387–400.
6. *Developmental changes in vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the human paravertebral ganglia* / V. Roudenok [et al.] // *Ann. Anat*. 1999. Vol. 181. P. 561–565.
7. *Roudenok, V. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) expression in the human neonatal paravertebral ganglia* / V. Roudenok // *Ann. Anat*. 2000. Vol. 182. P. 465–469.
8. *Enkephalin immunoreactive nerve fibres and cell bodies in sympathetic ganglia of guinea pig and rat* / M. Schultzberg [et al.] // *Neuroscience*. 1979. Vol. 4. P. 249–70.

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

Developmental changes in met-enkephalin immunoreactivity in the human sympathetic ganglia

Belarusian State Medical University, Minsk

By the method indirect immunohistochemistry with polyclonal antibodies against met-enkephalin (met-ENK) were investigated in the sympathetic ganglia of human newborns and adults. The results demonstrate a marked population (26 %) of m-ENK-immunoreactive (IR) neurons in sympathetic ganglia of newborns and solitary met-ENK-IR nerve cells and nerve fibers, as well as SIF cells of type II in ones of adults. It was suggested that these met-ENK-IR ganglionic cell structures participate in regulation local blood circulation and function of sweat glands. The existence of met-ENK in newborns ganglionic cells was suggested its inductive and trophic actions.

Key words: met-enkephalin, immunoreactivity, sympathetic ganglia, human, newborns, adults.