

О.С. Саёт, В.В. Руденок

ЭКСПРЕССИЯ БОМБЕЗИНА В ЗВЕЗДЧАТОМ ГАНГЛИИ ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Методом непрямой иммуногистохимии исследована экспрессия бомбезина в звездчатом ганглии человека. Выявлена небольшая популяция (до 3,6%) иммунореактивных к бомбезину нейронов, которая была представлена преимущественно клетками крупных и средних размеров. Обнаружены также единичные бомбезин-иммунореактивные нервные волокна с варикозными расширениями. Полученные данные являются свидетельством нейротрансмиттерной гетерогенности паравертебральных ганглиев человека.

Ключевые слова: бомбезин, экспрессия, звездчатый узел.

O.S. Saet, V.V. Roudenok

EXPRESSION OF BOMBESIN IN HUMAN STELLATE GANGLIA

Using the method of indirect immunohistochemistry the distribution patterns of bombesin were investigated in autopsy specimens of human stellate ganglia. Singly scattered bombesin-immunoreactive (IR) neurons were revealed. According to a quantitative evaluation, about 3.6% of the perikarya were immunopositive. Bombesin-IR nerve fibers and axonal varicosities located amongst neuronal cell bodies were also detected. These results support the thesis about the neurotransmitter heterogeneity of paravertebral ganglia.

Key words: bombesin, expression, stellate ganglion.

Нейроны симпатических ганглиев наряду с основными «классическими» медиаторами – норадреналином и ацетилхолином, содержат нейротрансмиттеры пептидной природы. Нейротрансмиттерный состав ганглионарных нейронов варьирует в одном и том же ганглии, в узлах различных топографических уровней, а также в симпатических узлах у разных видов млекопитающих животных. Очевидно, что классическая схема распределения медиаторов в нейронах вегетативной нервной системы нуждается в существенном дополнении.

Одним из нейротрансмиттеров пептидной природы является бомбезин. Впервые он был выделен из кожи амфибий (*Bombina orientalis*) [4], а затем обнаружен в центральной нервной системе, желудочно-кишечном тракте и легких млекопитающих животных [3,7,8]. Как показывают данные фармакологических исследований, бомбезин обладает выраженным гипотермическим действием. Более того, установлено, что вещества, проявляющие гипотермический эффект, могут также влиять на болевую чувствительность [10]. Ряд авторов указывает на способность бомбезина действовать в качестве эндогенного неопиоидного анальгетика [23]. Он также участвует в регуляции дыхания [2] и пищевого поведения [1], обладает положительным инотропным и вазопрессорным эффектами [6,9,14].

Изучению экспрессии бомбезина в нейронах вегетативных ганглиев млекопитающих животных посвящено значительное количество работ. Так, бомбезин-иммунореактивные (БОМ-ИР) нейроны обнаружены в подчревном [16] и верхнем брыжеечном [18] узлах белой крысы. Однако данные о распределении бомбезина в нейронах и волокнах симпатических узлов человека остаются фрагментарными.

Целью настоящей работы является установление экспрессии бомбезина в звездчатом ганглии человека.

Материалы и методы. Методом непрямой иммуногистохимии исследован аутопсийный материал звездчатых ганглиев девяти человек в возрасте от 45 до 59 лет. Все образцы получены и фиксированы до 24 часов после смерти. Фиксация звездчатого ганглия проводилась в 2% растворе Замбони, включающем в свой состав параформальдегид, пикриновую кислоту, одно- и двухзамещенные 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 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 (Dakopatts; X907). 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 бомбезину (Peninsula, N31030/L3). Извлеченные из темной увлажненной камеры по истечении срока инкубации препараты дважды по 10 минут промывались в кюветках с фосфатным буфером (рН 7.4).

При использовании непрямого иммунофлуоресцентного метода срезы обрабатывались сывороткой, содержащей конъюгированные с флуорофорами: СуЗ (СуЗ™-GARlgG, 30254, Jackson) вторичные антитела в разведении 1:100, и затем помещались на 2 часа в инкубационную камеру. После извлечения из инкубационной камеры, удаления сыворотки и двукратного промывания в фосфатном буфере (рН 7.4) срезы заключались в глицерин/фосфатный буфер (3:1) под покровные стекла. Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе Axiophot («Zeiss», Германия) с комбинациями фильтров для СуЗ индуцированной иммунофлуоресценции.

При использовании непрямого иммунопероксидазного метода на срезы микропипеткой наносилась козья сыворотка с вторичными антителами (GAR IgG, Dakopatts Z421) в разведении 1:100. Препараты помещались в инкубационную камеру на 12 часов при комнатной температуре (1820 °С). После удаления вторичных антител на срезы наносился раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный (ПАП) комплекс (Dakopatts Z113, разведение 1:100) и препараты помещались в камеру для инкубации на 12 часов при комнатной температуре (1820 °С). По истечении срока инкубации предметные стекла извлекались из инкубационной камеры и дважды по 10 минут промывались в кюветках с фосфатным буфером (рН 7.4) при комнатной температуре (1820 °С). Для выявления продукта реакции в качестве хромогена на срезы микропипеткой наносился 0,01% раствор диаминобензидина (Amerham) на 5-10 минут при комнатной температуре (1820 °С). Затем срезы промывались дистиллированной водой в кюветках в течение 10 минут при комнатной температуре (1820 °С) и заключались под покровные стекла с использованием акватекса (Merck). Оценка результатов исследования проводилась на светооптическом уровне при увеличении 400х с использованием универсального светооптического микроскопа. Продукт реакции в нейронах или нервных волокнах определялся в виде мелкодисперсных зерен коричневого цвета. Интенсивность реакции оценивалась как слабая, средняя и высокая.

Контроль иммуногистохимической реакции, тканевых антигенов, поликлональных антител, реагентов проводился в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

Для проведения морфометрического анализа нейронов производили исследование пяти областей (подкапсулярные зоны, центр, полюса узла) на каждом 10 срезе. При помощи анализатора изображений «Bioscan-NT» в выбранных областях определялось количество и максимальный диаметр перикарионов с контурирующимися ядрами, демонстрирующих положительную реакцию к бомбезину. Полученные числовые данные выражали в процентах. Нейроны по их максимальным диаметрам разделялись на следующие размерные группы: 10-24 мкм (мелкие), 25-35 мкм (средние), 36 мкм и более (крупные). Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» (Version 10-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 человека определялись единичные иммунопозитивные к бомбезину нейроны. Их популяция не превышала 3,6% от общего числа нервных клеток. Как правило, иммунореактивные (ИР) к бомбезину нейроны имели овальную или неправильную форму перикарионов

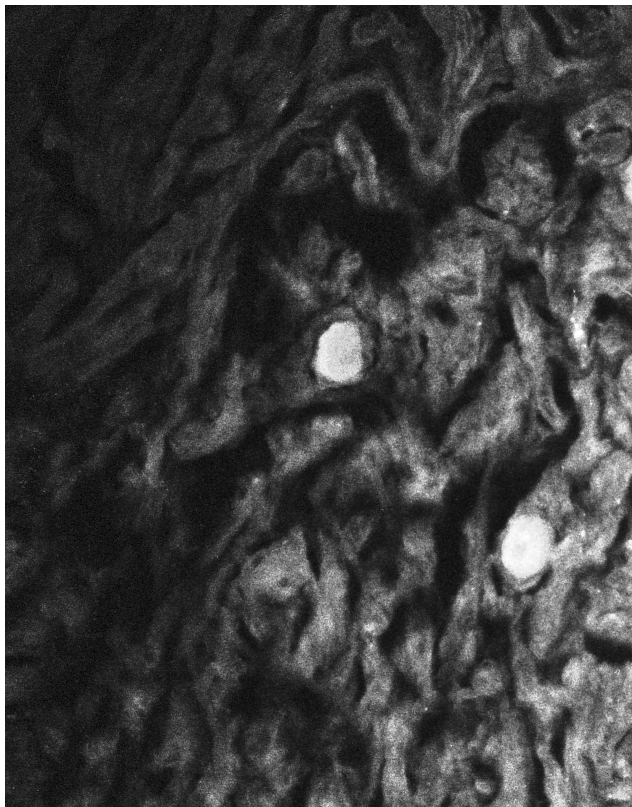


Рис. 1. Единичные иммунореактивные к бомбезину нейроны в центральной области звездчатого ганглия человека (непрямой иммунофлуоресцентный метод, ув.200)

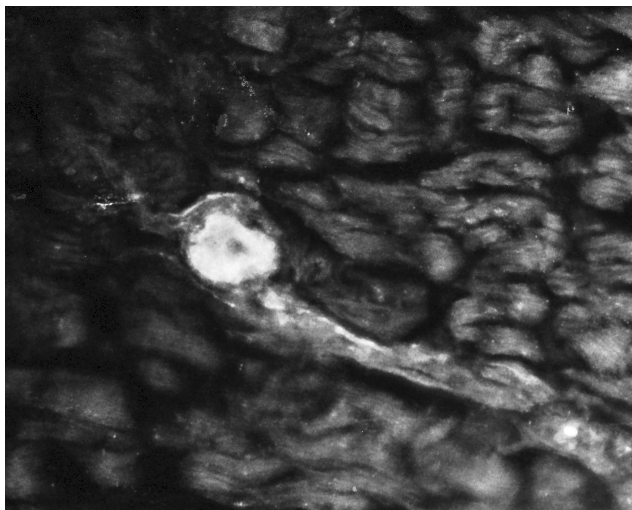


Рис. 2. Иммунореактивные к бомбезину нервная клетка и волокна в звездчатом ганглии человека (непрямой иммунофлуоресцентный метод, ув.600)

и располагались в центральных областях среза ганглия (рисунок 1). Продукт иммуногистохимической реакции в виде мелкодисперстных зерен был равномерно распределен в цитоплазме или концентрировался у одного из полюсов нервных клеток. Для иммунопозитивных к бомбезину нейронов была характерна неоднородность клеточного состава по размерам. Максимальный диаметр бомбезин-ИР перикарионов варьировал от 21 до 50 мкм. Крупные нейроны составили 62,1 %, нейроны средних

размеров – 28,3%, мелкие – 9,6%. Бомбезин-ИР нервные клетки нередко формировали кластеры, состоящие из 3-4 нейронов. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценивалась как слабая и средняя. При этом распределение иммунореактивности в нейронах не зависело от их размерного признака – в одинаковой степени иммунореактивность проявляли крупные, средние и мелкие клетки. Отдельные бомбезин-ИР нейроны имели небольшой протяженности отростки, заполненные зернами продукта реакции. Также определялись немногочисленные тонкие извитые бомбезин-ИР нервные волокна с мелкими варикозными расширениями (рисунок 2). Нередко иммунопозитивные волокна формировали корзинчатые структуры, оплетая бомбезин-иммунонегативные нейроны.

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют наличие экспрессии бомбезина в нейронах и волокнах звездчатого ганглия человека. Данные литературы указывают на присутствие бомбезина в симпатических ганглиях ряда млекопитающих животных. Так, бомбезин-ИР нервные волокна и МИФ-клетки найдены в подчревном узле белой крысы [16]. В верхнем брыжечном узле иммунопозитивными к бомбезину оказались основные (эфферентные) нейроны, а также многочисленные нервные волокна [18]. Полагают, что бомбезин может быть вовлечен в рефлекторные взаимодействия между кишкой и превертебральными узлами [18]. В чревном ганглии морской свинки также определялась высокая интенсивность экспрессия бомбезина в нервных волокнах [24].

У человека иммунореактивность к бомбезину выявлена в нервных волокнах поясничных симпатических ганглиев. Вместе с тем, сами нейроны оказались бомбезин-иммунонегативными [17]. По мнению ряда авторов, источником бомбезин-ИР волокон в поясничных узлах человека может быть небольшая популяция (до 5%) иммунореактивных к бомбезину нейронов, обнаруженных в спинномозговых ганглиях [17,21]. Более того, исследования с применением ретроградного аксонного транспорта ПХ и выборочной денервации показали, что часть нервных волокон нижнего брыжечного узла морской свинки происходят из подчревного и интрамуральных кишечных ганглиев [11,20]. Полагают, что у человека также может присутствовать популяция бомбезин-ИР волокон, проходящих от тазовых и/или интрамуральных ганглиев транзитом через превертебральные узлы к поясничным ганглиям [17].

Целый ряд экспериментальных и гистологических исследований демонстрирует важную роль звездчатого ганглия в симпатической иннервации сердца. Этот паравертебральный узел отдает многочисленные ветви, которые в свою очередь пронизывают все слои сердца и образуют густые сплетения. Нейромедиаторы и нейромодуляторы, которые содержатся в нейронах и волокнах шейно-грудного узла, способны не только модулировать синаптическую передачу, но и оказывать прямое регулирующее влияние на сердечную деятельность.

Некоторые авторы указывают на участие бомбезина в регуляции функции сердечно-сосудистой системы. Так, в экспериментальной модели кровотока нейропептид способен нормализовывать артериальное давление [19]. Более того, внутривенное введение бомбезина вызывает повышение частоты сердечных сокращений и оказывает вазопрессорное действие [6,9]. Однако во всех слоях сосудистой стенки отсутствуют специфические рецепторы для связи с бомбезином [26]. Полагают, что сосудистые

эффекты бомбезина опосредованы его способностью стимулировать высвобождение других вазоактивных веществ – нейротензина и вазоактивного интестинального полипептида [15]. В свою очередь, нейротензин изменяет тонус коронарных сосудов, действуя при этом видоспецифично: он обладает вазоконстрикторным эффектом у белой крысы [22], и вазодилатирующим – у морской свинки [5] и собаки [13]. Такая видоспецифичность может быть связана с механизмами, которые лежат в основе действия нейротензина. Вазоактивный интестинальный нейрорепептид также является сильным вазодилататором [12]. Вместе с тем, вокруг прекапилляров обнаружены густые сети иммунореактивных к бомбезину нервных волокон, что может быть обусловлено его нейромодулирующим и нейроэндокринным действием на кровоток [25].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии в звездчатом узле человека популяции иммунореактивных к бомбезину ганглионарных нейронов, что является свидетельством нейротрансмиттерной гетерогенности паравертебральных ганглиев.

Литература

1. Звенигородская, Л.А. Гормоны и типы пищевого поведения, эндоканнабиоидная система, пищевая аддикция в развитии метаболического синдрома / Л.А.Звенигородская, Т.В.Мищенко, Е.В.Ткаченко // Гастроэнтерология, 2009. – №1. – С.73-82.

2. Инюшкин, А.Н., Глазкова, Е.Н. Респираторные реакции на микроинъекции бомбезина в ядро солитарного тракта и их механизм реализации / А.Н. Инюшкин, Е.Н. Глазкова // Российский физиологический журнал, 2005. – №5. – С.521-529.

3. Aguayo, S.M. [et al.]. Increased levels of bombesin-like peptides in the lower respiratory tract of asymptomatic cigarette smokers / S.M. Aguayo [et al.] // J Clin Invest, 1989. – Vol. 84(№4). – P. 1105–1113.

4. Anaslasi, A. [et al.]. Isolation and amino acid sequence of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of Physalaemus fuscumaculatus / A. Anaslasi [et al.] // J M Arch. Biochem. Biophys, 1964. – Vol.108. – P. 341-348.

5. Bachelard, H. [et al.]. The coronary vasodilator effect of neurotensin in the guinea-pig isolated heart / H. Bachelard [et al.] // Peptides, 1986. – Vol. 7(№3). – P.431-435.

6. Bayorh, M.A., Feuerstein, G. Bombesin and substance P modulate peripheral sympathetic and cardiovascular activity / M.A. Bayorh, G. Feuerstein // Peptides, 1985. – Vol.1. – P. 115–120.

7. Bertaccini, G. [et al.]. The actions of bombesin on gastric secretion of the dog and the rat / G. Bertaccini [et al.] // Br J Pharmacol, 1973. – Vol. 49(№3). – P.437–444.

8. Brown, M.R. [et al.]. Bombesin affects the central nervous system to produce hyperglycemia in rats / M.R. Brown [et al.] // Life Sci, 1977. – Vol. 21(№12). – P.1729–1734.

9. Chahl, L.A., Walker, S.B. Response of the rat cardiovascular system to substance P, neurotensin and bombesin / L.A. Chahl, S.B. Walker // Life Sci, 1981. – Vol.29. – P. 2009–2015.

10. Charles, B. [et al.]. Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, 3-endorphin, other endogenous peptides, and morphine / B.Charles [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA, 1979. – Vol. 76(№10). – P. 5368–5371.

11. Dalsgaard, C.J., Elfvin, L.G. Structural studies on

the connectivity of the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig / C.J. Dalsgaard, L.G. Elfvin // J Auton Nerv Syst, 1982 – Vol. 5. – P. 265–278.

12. D'Orleans-Juste, P [et al.]. Effects of peptides and non-peptides on isolated arterial smooth muscles: role of endothelium / P. D'Orleans-Juste [et al.] // Eur J Pharmacol, 1985. – Vol. 114. – P.9–21.

13. Ertl, G. [et al.]. Effects of neurotensin and neuropeptide Y on coronary circulation and myocardial function in dogs / G. Ertl [et al.] // Amer J Physiol, 1993. – Vol.264. – P.1062–1068.

14. Fisher, L.A. [et al.]. Central nervous system cardiovascular effects of bombesin in conscious rats / L.A. Fisher [et al.] // Am J Physiol, 1985. – Vol. 248. – H.425–H431

15. Ghatei, M.A. [et al.]. Bombesin: action on gut hormones and calcium in man / M.A. Ghatei [et al.] // J Clin Endocrinol Metab, 1982. – Vol. 54(№5). – P. 980–985.

16. Helen, P. [et al.]. Bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP)- and Met5-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-like immunoreactivities in small intensely fluorescent (SIF) cells and nerve fibers of rat sympathetic ganglia / P. Helen [et al.] // J Histochem Cytochem, 1984. – Vol. 32(№11). – P.1131–1138.

17. Helen, P. [et al.]. Location of substance P, bombesin-gastrin-releasing peptide, [Met5]enkephalin- and [Met5]enkephalin-Arg6-Phe7-like immunoreactivities in adult human sympathetic ganglia / P. Helen [et al.] // Neuroscience, 1984. – Vol. 12(№3). – P.907–916.

18. Järvi, R. Localization of bombesin-, neuropeptide Y-, enkephalin- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities in rat coeliac-superior mesenteric ganglion / R. Järvi // Histochemistry, 1989. – Vol. 92(№3). – P.231–236.

19. Maryanovich, A.T. [et al.]. Intracerebroventricular injection of bombesin (6–14) restores blood pressure in hemorrhaged rabbits / A.T. Maryanovich [et al.] // Resuscitation, 1994. – Vol.27. – P.73–76.

20. Matthews, M. R., Cuello, A.C. Substance P-immunoreactive peripheral branches of sensory neurons innervate guinea-pig sympathetic neurons / M.R. Matthews, F.C. Cuello // Proc Natl Acad Sci USA, 1982. – Vol.79. – P.1668–1672.

21. Panula, P. [et al.]. Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons // J Neurosci, 1983. – Vol. 3(№10). – P.2021–2029.

22. Quirion, R. [et al.]. Neurotensin-induced vessels constriction in perfused rat heart / R. Quirion [et al.] // Eur.J.Pharmacol, 1979. – Vol.55. – P.221–223.

23. Raevskaya, O.S. [et al.]. Selectivity of analgesic effects of angiotensin and bombesin against dental and cutaneous nociceptive stimuli / O. S. Raevskaya [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1988. – Vol.106(№4). – P.1441–1443.

24. Schultzberg, M. Bombesin-like immunoreactivity in sympathetic ganglia / M. Schultzberg // Neuroscience, 1983. – Vol. 8(№2). – P.363–374.

25. Shen, Z. [et al.]. Peptide-containing neurons remain unaffected after intestinal autotransplantation: an experimental study in the piglet / Z. Shen [et al.] // Eur J Pediatr Surg, 1993. – Vol.3. – P.271–277.

26. Walsh, J. H. [et al.]. Bombesin-like peptides in mammals / J.H. Walsh [et al.] // Fed Proc, 1979. – Vol. 38(№9). – P.2315–2319.

Поступила 10.01.2014 г.