

© А.В. Шуклин, В.Н. Швалев, 2006
УДК 612.015.1:611.89:611.12

*А.В. Шуклин и В.Н. Швалев**

NO-СИНТАЗА ВО ВНУТРИСЕРДЕЧНЫХ ГАНГЛИЯХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИИ МИОКАРДА

Лаборатория нейроморфологии с группой электронной микроскопии (руков. — проф. В.Н. Швалев)
Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росздора, Москва

Экспрессия NO-синтазы (NOS) в интрамуральных нервных ганглиях сердца человека была изучена при помощи двух методик: гистохимической реакцией на NADPH-диафору и иммуногистохимической реакцией на NOS1. Для выявления влияния ишемической болезни сердца на экспрессию NOS были изучены сердца больных, умерших от сердечной недостаточности (n=8) и погибших от несчастных случаев (n=3, контроль). Выяснено, что в норме в нейронах сердца человека в основном экспрессируется NOS1, причем доля таких клеток составляет около 40%. При ишемии увеличивается число умеренно и слабо окрашенных NADPH-d-позитивных нейронов, что, возможно, связано с индукцией в них NOS2.

Ключевые слова: внутрисердечные ганглии, нейроны, NO-синтаза, человек, ишемия миокарда.

Оксид азота (NO) играет важную роль в регуляторных клеточных процессах в различных органах и тканях, в частности, в модуляции деятельности сердца. Вместе с тем функциональное значение NO по-прежнему во многом остается спорным. В организме он продуцируется ферментом NO-синтазой (NOS), который представлен нейрональной (NOS1), индуцибельной (NOS2) и эндотелиальной (NOS3) изоформами. В кардиомиоцитах различных областей сердца в разных условиях могут экспрессироваться все три изоформы NOS [3]. Нарушения работы сердца ассоциированы не только с индукцией NOS2, но и с изменениями локализации и экспрессии конститутивных NOS — NOS1 и NOS3 [6].

Как известно, сердечная деятельность в значительной степени находится под модулирующим влиянием нервной системы, вместе с тем, NO-ергические воздействия, направленные на интрамуральные ганглии и нервные волокна сердца, вносят основной вклад в физиологическую регуляцию его работы [4, 7]. Наиболее обильной является иннервация узлов автоматии сердца (пейсмекеров), проводящей системы и стенок предсердий [1]. В эпикарде последних расположена основная часть интрамуральных ганглиев сердца, содержащих эфферентные холинергические нейроны [1, 10].

В 1992 г. NOS была выявлена в нейронах и проводящей системе сердца крысы и морской свинки с помощью сразу двух реакций — иммунной и на NADPH-диафору (NADPH-d) [8]. Сведения о NO-ергических нейронах в сердце человека в литературе отсутствуют.

Цель данной работы — изучение характера экспрессии NOS в интрамуральных нервных ганглиях сердца человека, определение доли NO-ергических нейронов в норме и при ишемии миокарда и выяснение в них изоформного состава NOS.

Материал и методы. Исследованы предсердия 11 человек, умерших от различных видов ишемической болезни сердца (ИБС, n=8) и погибших от несчастных случаев (контроль, n=3). Использовали материал, полученный в пределах 6–16 ч после смерти. Наличие NOS в нейронах

определяли методом выявления активности NADPH-d в нервной ткани [14] и иммуногистохимически при помощи антител к NOS1. Кусочки латеральной стенки правого предсердия, не превышающие толщиной 0,5 см, фиксировали в 4% растворе параформа на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4) при температуре 4°C, в течение 2 ч, промывали 15% раствором сахарозы и замораживали в криостате. Изготавливали серийные срезы толщиной 10–20 мкм, которые монтировали на предметные стекла. Каждый 2-й срез помещали в инкубационную среду для выявления NADPH-d/NOS (состав: NADPH — 1 г/л; нитротетразолий — 0,1 г/л; тритон X-100 — 0,3%; фосфатный буфер 0,1 М, pH 7,4). Для иммуногистохимических исследований срезы дополнительно фиксировали в параформе в течение 1 сут. Визуализацию реакции проводили при помощи пероксидазной реакции.

Определяли относительное количество NO-ергических нейронов. С этой целью изготавливали 8–14 серийных срезов предсердий толщиной 20 мкм в области ганглия. На каждом 2-м из них выявляли NO-ергические нейроны; остальные срезы использовали для определения общего количества нейронов с помощью окрасок по Нисслию толуидиновым синим и кризильным фиолетовым, гематоксилином—эозином и гистохимической реакции на ацетилхолинэстеразу (АХЭ). Последнюю проводили по методу Карновского—Рутс, с применением ацетилтиохсинийодида (Sigma, Германия).

Результаты исследования. В ходе работы было выяснено, что окраски по Нисслию и гематоксилином—эозином не всегда позволяют выявить все тела нейронов, находящиеся на срезе. На серийных препаратах часто можно было видеть, как на соседних срезах один и тот же нейрон выявлялся при реакции на NOS, но не окрашивался толуидиновым синим или кризильным фиолетовым, причем хорошо окрашивающиеся ядра сателлитных клеток образовывали на месте нейрона характерную ячейку — пространство, где отсутствовали соединительнотканые и глиальные элементы. Долю окрашенных по Нисслию клеток увеличивала предшествующая окраске непродолжительная инкубация срезов в 96° этиловом спирте.

Гистохимическая реакция на АХЭ (рис. 1) позволяла непосредственно идентифицировать все нервные клетки на срезе, что согласуется с данными о холинергической природе внутрисердечных нейронов. Однако

*E-mail: senter 65@list.ru

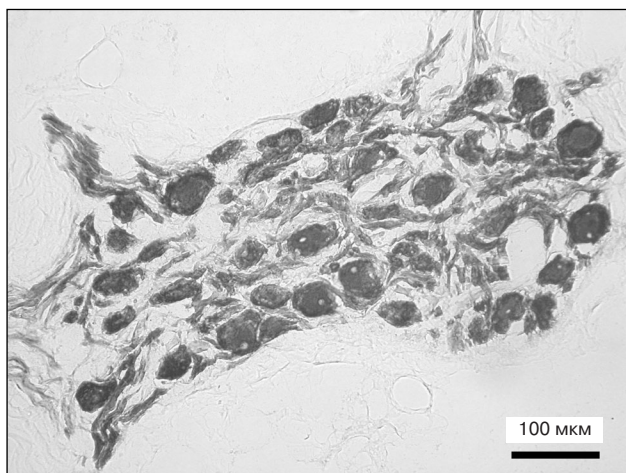


Рис. 1. Гистохимическая реакция на ацетилхолинэстеразу во внутрисердечном ганглии человека. Тотальное выявление нейронов на срезе.

использование этой гистохимической реакции было возможно только совместно с NADPH-d, где требуется фиксация в течение 1–2 ч. Для выявления общего количества нейронов при иммуногистохимическом методе использовалось окрашивание толуидиновым синим.

Сопоставление гистохимической и иммуногистохимической реакций на NOS позволило заключить, что при гистохимическом выявлении NADPH-d NOS1 содержат только темно-окрашенные, но не слабо или умеренно окрашенные нервные клетки. У человека в норме в интрамуральных ганглиях сердца (рис. 2, а) доля NO-ергических клеток от общего

числа холинергических нейронов составляет приблизительно 40%. Наряду с перикарионами, при реакции на NADPH-d обычно окрашивались отдельные волокна в составе нервных пучков, а также эндотелий сосудов. У человека NOS экспрессируется в перичеселлярных аппаратах аксонов, оканчивающихся на внутрисердечных нейронах. При ишемии миокарда в ганглиях сердца, как правило, наблюдалось увеличение количества нейронов с интенсивной и слабой реакцией на NADPH-d (см. рис. 2, б). При постинфарктных состояниях, ассоциированных с гипертонической болезнью, возрастало число интенсивно окрашенных NADPH-d-позитивных нейронов.

Обсуждение полученных данных. Как известно, основная роль NO, вырабатываемого нейрональной изоформой NOS в парасимпатических окончаниях, — пресинаптическое усиление выделения ацетилхолина терминалями блуждающих нервов [4, 7]. Напротив, в симпатических нервных волокнах сердца NO подавляет высвобождение норадреналина [9]. Облегчение выделения ацетилхолина парасимпатическими волокнами под возросшим NO-ергическим влиянием лежит в основе брадикардии, в частности, возникающей под воздействием физических тренировок [5]. Можно предположить, что механизмы увеличения NO-ергического влияния в условиях сердечной патологии и при повышенной физической нагрузке сходны, хотя имеют различные причины, вызывающие данные фенотипические изменения экспрессии NOS.

Кроме того, появление слабоокрашенных NADPH-d-позитивных нейронов при ишемии можно

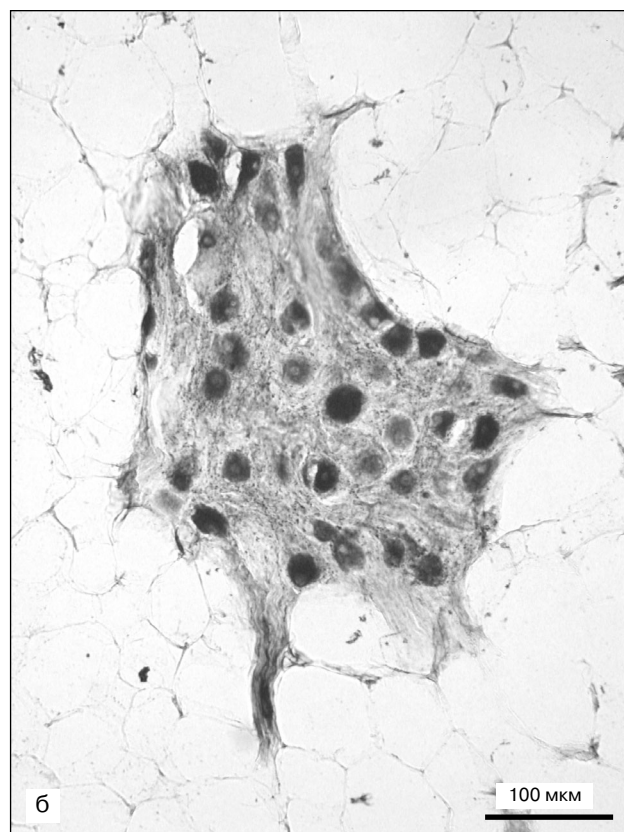
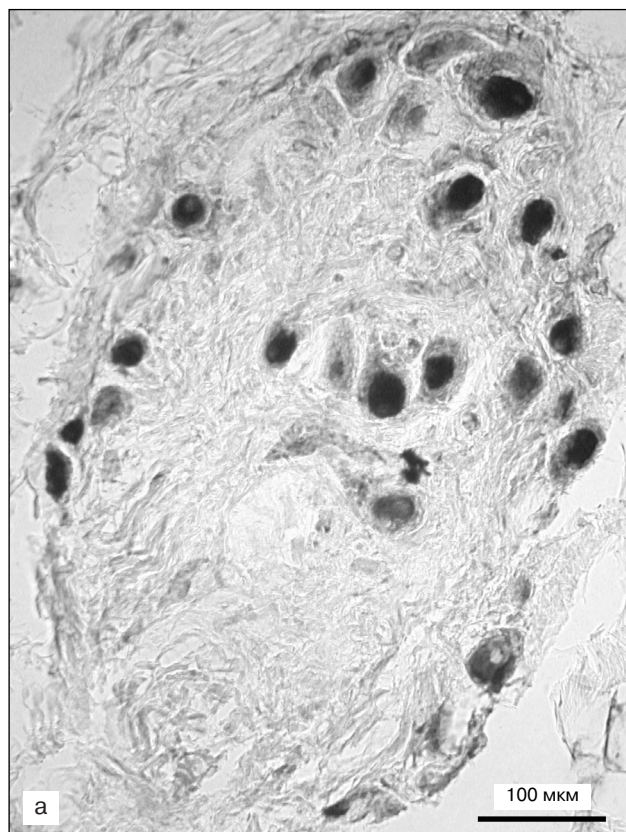


Рис. 2. Экспрессия NO-синтазы во внутрисердечном ганглии человека.

а — контроль; б — ишемия миокарда. Реакция на NADPH-диафорузу.

связать с индукцией в них NOS2, которая, как известно, наблюдается при сердечной недостаточности [13].

По данным, полученным при анализе интрамуральных ганглиев морской свинки на тотальных препаратах предсердий, существуют 4 области сердца, где локализуются NO-ергические нейроны: район верхней и нижней полых вен, область входа легочных вен в левое предсердие и межпредсердная перегородка [12]. Распределение NOS во внутрисердечных ганглиях и нервных волокнах сердца изучено также на ультраструктурном уровне [11]. У животных в норме, по некоторым оценкам, доля NO-ергических нейронов в сердце составляет: у белой крысы — 4% [8], у морской свинки — около 20% [8, 12], у собаки — 30–40% [2]. Исследования с использованием флюоресцентных антител показали солокализацию в нейронах интрамуральных ганглиев сердца мыши и крысы NOS и ацетилхолинэстеразы [4, 5, 10].

Поскольку как из наших экспериментов, так и из данных литературы [1, 4, 10] следует, что все внутрисердечные нейроны имеют холинергический фенотип, можно сделать заключение о солокализации NOS и АХЭ в нейронах сердца у человека и о вероятной принадлежности всех внутрисердечных NO-ергических нейронов к парасимпатическому отделу. В целом, характеризуя экспрессию NOS в ганглиях сердца человека, необходимо отметить ее более высокий уровень по сравнению с экспрессией у изученных экспериментальных животных. Есть и структурные различия, такие как отсутствие у крыс [10], но наличие у человека, NOS в преганглионарных парасимпатических волокнах сердца. В функциональном отношении, по-видимому, это указывает на различный вклад NO-ергической системы в регуляцию деятельности сердца у человека и животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Швалева В.Н., Сосунов А.А. и Гуски Г. Морфологические основы иннервации сердца. М., Наука, 1992.
2. Armour J.A., Smith F.M., Losier A.M. et al. Modulation of intrinsic cardiac neuronal activity by nitric oxide donors induces cardiodynamic changes. *Am. J. Physiol.*, 1995, v. 268, №2, Pt. 2, p. R403–R413.
3. Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A. et al. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, v. 90, № 1, p. 347–351.
4. Choate J.K., Danson E.J., Morris J.F. and Paterson D.J. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2001, v. 281, № 6, p. H2310–H2317.
5. Danson E.J. and Paterson D.J. Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. *J. Physiol.*, 2003, v. 546, Pt. 1, p. 225–232.
6. Danson E.J., Zhang Y.H., Sears C.E. et al. Disruption of inhibitory G-proteins mediates a reduction in atrial beta-adrenergic signaling by enhancing eNOS expression: Augmented eNOS signaling in atrial myocytes. *Cardiovasc. Res.*, 2005, v. 67, № 4, p. 613–623.
7. Herring N., Danson E.J. and Paterson D.J. Cholinergic control of heart rate by nitric oxide is site specific. *News Physiol. Sci.*, 2002, v. 17, № 10, p. 202–206.
8. Klimaschewski L., Kummer W., Mayer B. et al. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ. Res.*, 1992, v. 71, № 6, p. 1533–1537.
9. Mohan R.M., Choate J.K., Golding S. et al. Peripheral presynaptic pathway reduces the heart rate response to sympathetic activation following exercise training: role of NO. *Cardiovasc. Res.*, 2000, v. 47, № 1, p. 90–98.
10. Richardson R.J., Grkovic I. and Anderson C.R. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tiss. Res.*, 2003, v. 314, № 3, p. 337–350.
11. Sosunov A.A., Hassall C.J., Loesch A. et al. Nitric oxide synthase-containing neurones and nerve fibres within cardiac ganglia of rat and guinea-pig: an electron-microscopic immunocytochemical study. *Cell Tiss. Res.*, 1996, v. 284, № 1, p. 19–28.
12. Tanaka K., Hassall C.J. and Burnstock G. Distribution of intracardiac neurones and nerve terminals that contain a marker for nitric oxide, NADPH-diaphorase, in the guinea-pig heart. *Cell Tiss. Res.*, 1993, v. 273, № 2, p. 293–300.
13. Ungureanu-Longrois D., Balligand J.L., Simmons W.W. et al. Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to beta-adrenergic agonists. *Circ. Res.*, 1995, v. 77, № 3, p. 494–502.
14. Vincent S.R. and Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 1992, v. 46, № 4, p. 755–784.

Поступила в редакцию 16.01.2006 г.

DEMONSTRATION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE IN HUMAN INTRACARDIAC GANGLIA IN NORMAL AND ISCHEMIC MYOCARDIUM

A.V. Shuklin and V.N. Shvalyov

Nitric oxide synthase (NOS) expression in human intracardiac ganglia was studied using two techniques — histochemical demonstration of NADPH-diaphorase and immunohistochemical staining for NOS1. To detect the influence of coronary heart disease on NOS expression, hearts were studied in patients that died from heart failure (n=8) and in persons that died in accidents (n=3, control). It was found that human intracardiac neurons normally expressed mainly NOS1, and the proportion of these cells amounted to about 40%. A portion of neurons with low and moderate density of staining for NADPH-diaphorase was increased in ischemic myocardium, probably, due NOS2 induction.

Key words: *intracardiac ganglia, neurons, nitric oxide synthase, myocardial ischemia, man.*

Laboratory of Neuromorphology with the Electron Microscopy Group, Russian Cardiology Scientific Complex, Moscow.