

Нейропептиды и регуляция морфофункционального состояния тучных клеток при хирургическом повреждении миокарда

Д. Л. Синцов, Е. С. Головнева, Г. К. Попов

ОГУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии», г. Челябинск

Резюме

Изучена активность тучных клеток и экспрессия субстанции Р и кортикотропин-релизинг фактора в миокарде после лазерного и механического повреждения. Повышение экспрессии субстанции Р было отмечено на 1-2 минутах после повреждающего воздействия, что коррелировало с максимальной дегрануляцией тучных клеток. Максимум экспрессии кортикотропин-релизинг фактора отмечался к 5 суткам опыта, в период активного неангиогенеза и начала репаративных процессов. Полученные данные подтверждают функции субстанции Р, как медиатора альтернативных процессов, а кортикотропин-релизинг фактор после лазерного повреждения сердца играет протективную роль.

Ключевые слова: тучные клетки, субстанция Р, кортикотропин-релизинг фактор, лазер.

Введение

В последнее десятилетие операции трансмиокардиальной реваскуляризации, выполняемые с использованием высокоинтенсивных лазеров (ТМЛР), прочно вошли в практику сердечно-сосудистой хирургии. Однако, несмотря на определенные успехи, достигнутые фундаментальной наукой в изучении механизмов взаимодействия лазерного излучения и сердечной ткани, существует ряд невыясненных моментов, касающихся ранних этапов стимуляции лазером клеточных реакций и процессов неангиогенеза.

Показано, что одной из первых клеточных популяций, реагирующих на лазерное воздействие, являются тучные клетки. Усиление их дегрануляции и увеличение количества в миокарде является триггерным моментом формирования новой сосудистой сети [1, 2, 3].

При этом остается спорным вопрос, какие именно факторы вызывают описанную реакцию мастоцитов, является ли дегрануляция тучных клеток следствием термического повреждения или опосредована какими-то другими воздействиями на клетку.

Ряд исследователей полагают, что в повышении функциональной активности тучных клеток ведущую роль играют нейропептиды, такие как субстанция Р и кортикотропин-релизинг фактор (КРФ) [4]. Установлено, что на ранних этапах воспаления именно субстанция Р выступает дегранулятором мастоцитов, но экспрес-

сия субстанции Р и КРФ после лазерного повреждения тканей до сих пор не изучалась.

Вышеупомянутые нейропептиды поступают в миокард по симпатическим нервным стволам, хотя КРФ может автономно синтезироваться клетками иммунной системы (лимфоцитами и макрофагами), а у некоторых видов животных — кардиомиоцитами и эндотелием [5].

Установлено, что КРФ и родственные ему пептиды способны защищать кардиомиоциты от ишемического повреждения в условиях гипоксии и устранять сосудистый спазм [6]. Наоборот, субстанция Р, опосредовано через дегрануляцию тучных клеток и сужение просвета сосудов, играет роль в развитии приступов стенокардии и возникновении инфаркта миокарда [7].

Поэтому важно было установить динамику уровней экспрессии нейропептидов в сердце после хирургического лазерного вмешательства, что особенно актуально для профилактики возможных осложнений у больных ИБС.

Выяснение роли нейропептидов в регуляции реакций миокардиальных тучных клеток, несомненно, имеет важное значение для понимания механизмов неангиогенеза, стимулированного лазерным повреждением тканей сердца.

Материал и методы

Проведение эксперимента осуществлялось на 132 половозрелых беспородных крысах. Изучались 4 экспериментальные группы: однократное высокоинтенсивное лазерное воздействие (инфракрасный диодный лазер ALTO, Россия) на нормальный миокард, лазерное воздействие на ишемизированный ми-

Е. С. Головнева — д. м. н.,

Г. К. Попов — д. м. н., профессор.

Таблица 1. Динамика количества тучных клеток после повреждения интактного миокарда

Параметры	После лазерного повреждения	После механического повреждения
Интактный миокард	5,81±0,60	5,81±0,60
1 минута	8,72±0,62* **	5,06±0,40
1 час	14,69±0,84*	13,70±1,08*
1 сутки	12,62±0,76*	10,46±0,39*
5 суток	10,38±0,71*	8,88±0,51*

Примечание. * — достоверное различие между показателями до и после повреждения сердца ($p < 0,0125$); ** — достоверное различие между показателями групп животных с лазерным и механич. воздействием ($p < 0,0125$).

окард с формированием канала; механическое формирование канала с использованием стерильной иглы в нормальном и ишемизированном миокарде. Повреждение миокарда было локализовано в стенке левого желудочка.

Выведение животных из эксперимента проводилось через 1 минуту, 1 час, 1 и 5 суток. Содержание животных и выведение их из эксперимента соответствовало правилам содержания животных в неволе. Кусочки ткани миокарда фиксировали нейтральным формалином и после стандартной гистологической обработки получали парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином для уточнения локализации повреждения ткани миокарда и толудиновым синим (рН 2,0) для выявления тучных клеток. Ишемические изменения кардиомиоцитов выявляли окраской ГОФПК. Уровень экспрессии кортикотропин-релизинг фактора и субстанции Р определялся на замороженных криостатных срезах миокарда иммуно-гистохимическим методом с применением специфических антител (SIGMA) и системы иммуномечення IMMUMARK (ICN). В качестве ферментной метки использовали щелочную фосфатазу, которую затем выявляли окраской по Бернстон. Морфометрические исследования проводились с использованием компьютерной системы анализа видеоизображения «Диаморф-цито». Статистическая обработка цифровых данных проводилась методом непараметрической статистики с использованием критерия Ньюмена-Кейлса и ранговой корреляции по Спирмену с помощью комплекта компьютерных программ Microsoft Excel 2000, «Диаморф Илсо®». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия кортикотропин-релизинг фактора в интактном миокарде была выражена в адвентиции артериальных сосудов и в ткани

Таблица 2. Динамика количества тучных клеток после повреждения ишемизированного миокарда

Параметры	После лазерного повреждения	После механич. повреждения
Ишемизированный миокард	5,56±0,33	5,56±0,33
1 минута	7,02±0,76* **	5,06±0,31
1 час	9,63±0,58* **	7,47±0,48*
1 сутки	7,72±0,39* **	6,06±0,60
5 суток	6,31±0,35**	4,90±0,35

Примечание. * — достоверное различие между показателями до и после повреждения сердца ($p < 0,0125$); ** — достоверное различие между показателями групп животных с лазерным и механич. воздействием ($p < 0,0125$).

миокарда, окружающей артерии крупного и среднего калибра. Также значительная экспрессия КРФ была отмечена в эпикардиальных областях. Базальный уровень экспрессии КРФ составлял 22,99±1,02 у.е. После лазерного повреждения и после механического воздействия отмечалось плавное нарастание экспрессии КРФ к 5 суткам опыта до 34,34±1,02 у.е. после лазерного и до 21,59±1,00 у.е. после механического повреждения интактного миокарда.

Экспрессия субстанции Р в исследованных препаратах сердца выявлялась в адвентициальной оболочке коронарных артерий и крупных венозных сосудов и в первые минуты эксперимента в стенках сформированного лазером канала. В зоне механического повреждения миокарда не было выявлено значительного усиления экспрессии субстанции Р. На ранних сроках (минуты, 1 час) субстанция Р экспрессировалась максимально (22,94±1,40 у.е. после механического и 18,85±1,08 у.е. после лазерного повреждения миокарда), к 5 суткам уровень этого нейропептида в тканях снижался (7,47±0,55 у.е. после механического и 8,29±0,65 у.е. после лазерного повреждения миокарда) до базальных уровней.

Количество тучных клеток в ткани миокарда начинало нарастать сразу же после экспериментального повреждения, причем после лазерного воздействия отмечалось достоверно большее увеличение количества мастоцитов по сравнению с механическим (табл. 1, 2). Максимальное число тучных клеток наблюдалось через час после воздействия, затем их количество начинало снижаться.

Индекс дегрануляции тучных клеток (ИДТК), представляющий собой соотношение количества дегранулированных тучных клеток к общему числу тучных клеток, резко нарастал сразу же после повреждения и был максимален в первые минуты после воздействия,

Таблица 3. Динамика индекса дегрануляции тучных клеток после воздействия на нормальный миокард

Параметры	Лазерное воздействие	Механическое воздействие
Нормальный миокард	31,62±0,93	31,62±0,93
1 минута	76,60±2,10* **	58,06±2,05*
1 час	72,06±3,35*	68,57±3,30*
1 сутки	68,56±1,90*	60,56±4,00*
5 суток	55,04±1,65*	48,12±1,30*

Примечание. * — достоверное различие показателей до и после повреждающего воздействия ($p < 0,05$); ** — достоверное различие между показателями групп животных с лазерным и механическим воздействием ($p < 0,05$).

постепенно снижаясь к 5 суткам. При лазерном воздействии на сердце индекс дегрануляции тучных клеток был несколько выше, чем при механическом воздействии на сроках 1 минута (в нормальном миокарде), 1 сутки (в ишемизированном миокарде) (табл. 3, 4).

Изучение динамики площади ишемических изменений миокарда по данным окраски ГОФПК (выраженная фуксинофилия кардиомиоцитов) выявило отсутствие достоверной разницы по этому показателю между группами животных с механическим и лазерным повреждением миокарда.

Обнаруживались отличия сосудистой реакции в зонах повреждения на 5 сутки эксперимента. В группе с лазерным воздействием диаметр внутреннего просвета капилляров, артерий и вен был больше, а толщина стенки сосудов несколько меньше, чем у животных с механическим повреждением сердца, при этом удельная площадь кровеносных сосудов в группе с лазерным воздействием была достоверно больше, чем в группе с механическим повреждением, что свидетельствовало о более выраженном процессе неоангиогенеза.

Корреляционный анализ динамики индекса дегрануляции и количества тучных клеток в миокарде после лазерного и механического повреждения и динамики экспрессии субстанции Р и кортикотропин-релизинг фактора показал, что существует прямая корреляционная зависимость сильной степени между ИДТК и экспрессией субстанции Р и обратная корреляционная зависимость между ИДТК и экспрессией КРФ, а также прямая корреляционная зависимость средней силы между количеством тучных клеток и экспрессией субстанции Р.

Обсуждение

Проведенные эксперименты подтверждают роль субстанции Р как сильнейшего стиму-

Таблица 4. Динамика индекса дегрануляции тучных клеток после повреждения ишемизированного миокарда

Параметры	Лазерное воздействие	Механическое воздействие
Ишемизирован. миокард	29,22±0,95	29,22±0,95
1 минута	67,83±1,33*	71,33±3,10*
1 час	70,31±2,75*	57,86±3,20*
1 сутки	59,83±3,41* **	38,07±3,49
5 суток	44,16±1,39*	40,49±2,08

Примечание. * — достоверное различие показателей до и после повреждающего воздействия ($p < 0,05$); ** — достоверное различие между показателями групп животных с лазерным и механическим воздействием ($p < 0,05$).

лятора дегрануляции тучных клеток после хирургического повреждения миокарда, вне зависимости от вида произведенного воздействия (лазерное или механическое). Можно предполагать, что усиление экспрессии субстанции Р в первые минуты после локального повреждения миокарда является одним из факторов, привлекающих тучные клетки в зону развивающегося воспаления.

Полученные результаты показали, что КРФ не оказывал такого выраженного влияния на дегрануляцию тучных клеток как субстанция Р, более того, усиление экспрессии этого нейропептида сопровождалось некоторым снижением индекса дегрануляции мастоцитов. Таким образом, повышение уровня кортикотропин-релизинг фактора при лазерном воздействии не только не оказывает негативного влияния, но и может способствовать процессу восстановления миокарда и последующему неоангиогенезу, о чем свидетельствует наблюдаемая динамика сосудистой реакции и ишемических изменений. По нашему мнению, кортикотропин-релизинг фактор может являться одним из локальных регуляторов протективных и репаративных процессов в сердце. Это предположение подтверждается рядом исследований защитной роли КРФ и родственных пептидов при ишемическом повреждении миокарда [6, 8].

Литература

1. Головнева Е. С. Роль тучных клеток в процессе неоангиогенеза, стимулированного воздействием высокоинтенсивного лаз. излучения. Лаз. мед. 2001; 5(3): 29-32.
2. Головнева Е. С., Попов Г. К., Козель А. И. Механизмы лазерной стимуляции неоангиогенеза. Известия Челябинского научного центра. Спец. вып. 2004; 25: 71-74.
3. Астахова Л. В., Гиниатуллин Р. У. Роль тучных клеток в приживлении аутодермотрансплантата после воздействия высокоэнергетического лазерного излучения. Лазерная медицина. 2001; 5(3): 37-40.

Полный список литературы см. на сайте umj.ru