

ISSN 1607-419X

ISSN 2411-8524 (Online)

УДК 611.018.83:617.762.7:616.131

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование нервных волокон и ганглиев в периартериальной жировой ткани бифуркации легочной артерии у пациентов с легочной гипертензией и без нее

Л. Б. Митрофанова, А. А. Перминова,
Н. С. Гончарова, Е. Н. Михайлов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Митрофанова Любовь Борисовна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
Тел.: +7(812)702–37–49 (доб. 005991).
E-mail: ryazanov_pa@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию
27.06.19 и принята к печати 03.09.19.*

Резюме

Актуальность. Одним из возможных методов снижения давления в легочной артерии (ЛА) при легочной гипертензии (ЛГ) является радиочастотное повреждение периартериальных нервных волокон. В то же время степень влияния вегетативной нервной системы еще до конца не определена. Также известно, что дофамин индуцирует вазорелаксацию ЛА, однако подтипы дофаминовых рецепторов, вовлеченные в этот механизм, еще не идентифицированы. **Цель** — морфологическое исследование нервных волокон и ганглиев в периартериальной жировой ткани бифуркации ЛА у пациентов с ЛГ и без нее. **Материалы и методы.** Тканевые образцы зоны бифуркации ЛА с окружающей жировой клетчаткой забраны у 8 пациентов с ЛГ и 9 пациентов без ЛГ (аутопсийный материал): 7 женщин в возрасте 59 ± 22 лет и 10 мужчин 62 ± 15 лет. Проводилась иммуногистохимическая реакция с антителами к белку S100, tyrosine hydroxylase (ТН), мускариновому рецептору M1, дофаминовым рецепторам D1, D2, D5. Оценивались количество нервных волокон и ганглиев на площадь препарата, их диаметр и глубина расположения относительно интимы ЛА. **Результаты.** Статистически значимых различий в строении и размерах нервных волокон и ганглиев у пациентов с ЛГ и без нее выявлено не было. В целом среднее количество нервных волокон на площадь препарата (4 см^2) было $29,1 \pm 15,5$; ганглиев — $1,1 \pm 1,3$; средний диаметр волокон — $130,6 \pm 35,1$ мкм, ганглиев — $532,0 \pm 790,7$ мкм; среднее расстояние волокно–интима — $2141,4 \pm 663,3$ мкм, ганглий–интима — $1799,0 \pm 500,5$ мкм. Плотность волокон вокруг бифуркации ЛА была выше ($p = 0,04$) у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) II функционального класса (ФК) (20 ± 10 волокон/ 4 см^2) по сравнению с пациентами с ХСН III–IV ФК (11 ± 4 волокон/ 4 см^2). Экспрессия M1 и ТН определялась на нервных волокнах и ганглиях, в эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА, в эпителии бронхов. При этом, в отличие от M1, экспрессия ТН наблюдалась не на всех нервных клетках, а ее уровень варьировал от 1 до 4 баллов. Экспрессии D2-рецептора выявлено не было, экспрессия D1 была слабо выражена, а D5–4 балла во всех случаях на эндотелии и гладкомышечных

клетках ЛА. **Заключение.** Морфометрический анализ нервных волокон и ганглиев не выявил различий между пациентами с ЛГ и без нее. Отмечалось значимое снижение количества нервных волокон по мере прогрессирования сердечной недостаточности. Экспрессия ТН на нервных волокнах и ганглиях была меньше выражена и наблюдалась не на всех клетках по сравнению с М1-рецептором. Экспрессия дофаминовых рецепторов была выявлена только на эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА. Дальнейшее морфологическое исследование на большем материале позволит создать теоретическую базу обоснованности интервенционной иннервации ЛА.

Ключевые слова: гистологическое и иммуногистохимическое исследование, морфометрический анализ, нервные волокна и ганглии периартериальной жировой ткани бифуркации легочной артерии, легочная гипертензия

Для цитирования: Митрофанова Л. Б., Перминова А. А., Гончарова Н. С., Михайлов Е. Н. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование нервных волокон и ганглиев в периартериальной жировой ткани бифуркации легочной артерии у пациентов с легочной гипертензией и без нее. *Артериальная гипертензия.* 2019;25(5):498–509. doi: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-498-509

Histological and immunohistochemical study of nerve fibers and ganglia in the periarterial adipose tissue of the pulmonary artery bifurcation in patients with and without pulmonary hypertension

L. B. Mitrofanova, A. A. Perminova,
N. S. Goncharova, E. N. Mikhaylov
Almazov National Medical Research Centre,
St Petersburg, Russia

Corresponding author:
Lyubov B. Mitrofanova,
Almazov National Medical
Research Centre,
2 Akkuratov street, St Petersburg,
197341 Russia.
Phone: +7(812)702–37–49 (add. 005991).
E-mail: ryazanov_pa@almazovcentre.ru

*Received 27 June 2019;
accepted 3 September 2019.*

Abstract

Background. One of the possible methods of reducing pressure in the pulmonary artery (PA) in pulmonary hypertension (PH) is radiofrequency damage of the periarterial nerve fibers. At the same time, the impact of the autonomic nervous system has not been fully determined yet. It is also known that dopamine induces LA vasorelaxation, however, the subtypes of dopamine receptors involved in this mechanism have not yet been identified. **Objective.** To assess the morphology of nerve fibers and ganglia in the periarterial adipose tissue of the PA bifurcation in patients with and without PH. **Design and methods.** Tissue samples of the PA bifurcation zone with surrounding fatty tissue were taken from 8 patients with PH and 9 patients without PH (autopsy material): 7 women aged 59 ± 22 years and 10 men 62 ± 15 years. An immunohistochemical reaction was performed with antibodies to S100 protein, tyrosine hydroxylase (TH), M1 muscarinic receptor, D1, D2, D5 dopamine receptors. The number of nerve fibers and ganglia per area of the preparation, their diameter and depth relative to the PA intima were estimated. **Results.** There were no statistically significant differences in the structure and size of nerve fibers and ganglia in patients with and without PH. In general, the average number of

nerve fibers per area of the preparation (4 cm^2) was $29,1 \pm 15,5$; ganglia — $1,1 \pm 1,3$; the average fiber diameter was $130,6 \pm 35,1 \text{ }\mu\text{m}$, ganglia — $532,0 \pm 790,7 \text{ }\mu\text{m}$; the average fiber-intima distance was $2141,4 \pm 663,3 \text{ }\mu\text{m}$, the ganglion-intima — $1799,0 \pm 500,5 \text{ }\mu\text{m}$. The density of fibers around the PA bifurcation was significantly higher ($p = 0,04$) in patients with chronic heart failure (CHF) II NYHA functional class (FC) (20 ± 10 fibers / 4 cm^2) compared to patients with CHF III–IV FC (11 ± 4 fibers / 4 cm^2). The expression of M1 and TH was determined on nerve fibers and ganglia, in the endothelium and smooth muscle cells of the PA, in the epithelium of the bronchi. At the same time, unlike M1, the expression of TH was not observed in all nerve cells, and its level ranged from 1 to 4 points. No D2 receptor expression was detected, D1 expression was mild, and D5 was 4 points in all cases in the endothelium and smooth muscle cells of the LA. **Conclusions.** Morphometric analysis of nerve fibers and ganglia revealed no differences between patients with and without PH. There was a significant decrease in the number of nerve fibers with the progression of heart failure. TH expression on nerve fibers and ganglia was less pronounced and was not observed in all cells as compared with the M1 receptor. Expression of dopamine receptors was detected only in the endothelium and smooth muscle cells of the PA. Further morphological study involving larger sample will allow the substantiation for the validity of the interventional innervation of the PA.

Key words: histological and immunohistochemical study, morphometric analysis, nerve fibers and ganglia of periarterial adipose tissue of pulmonary artery bifurcation, pulmonary hypertension

For citation: Mitrofanova LB, Perminova AA, Goncharova NS, Mikhaylov EN. Histological and immunohistochemical study of nerve fibers and ganglia in the periarterial adipose tissue of the pulmonary artery bifurcation in patients with and without pulmonary hypertension. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2019;25(5):498–509. doi: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-498-509

Введение

Легочная гипертензия (ЛГ) — это клинический синдром, характеризующийся вазоконстрикцией, ремоделированием сосудов и тромбозом. Она может быть первичной или осложнять течение разных заболеваний. Прогрессирующие последствия ЛГ включают повышенное сопротивление легочных сосудов, гипертрофию и дисфункцию правого желудочка и, в конечном итоге, смерть [1]. Степень вовлечения вегетативной нервной системы в патогенез ЛГ до конца не изучена [2]. Постулируется, что пациенты с ЛГ часто имеют низкий сердечный выброс, который компенсируется путем активации нейрогормональных систем, таких как симпатическая нервная система и ренин-ангиотензин-альдостероновая система [3]. Легочная сосудистая сеть иннервируется симпатическими и парасимпатическими нервными волокнами. Повышенное сосудистое сопротивление опосредуется α -адренорецепторами при стимуляции симпатического нерва [4]. Норадренергические волокна активируются барорецепторами в легочной артерии (ЛА) [5] и проксимальных сегментах дыхательных путей [6]. Хеморецепторы реагируют на снижение уровня pO_2 в артериях, повышая стимуляцию симпатического нерва нейронами симпатической цепи [7]. Парасимпатическая активация посредством вагусной стимуляции приводит к холинергически опосредованной релаксации ЛА [8].

Дофаминовые рецепторы — класс трансмембранных метаболитных G-белок-связанных клеточных рецепторов, играющих важную роль

в функционировании центральной нервной системы млекопитающих. Основным эндогенным лигандом — агонистом этих рецепторов — дофамин. Дофаминовые рецепторы участвуют в процессах мотивации, обучения, тонкой моторной координации, модулирования нейроэндокринных сигналов. Этот класс включает пять типов рецепторов: D1, D2, D3, D4 и D5. У людей ЛА экспрессирует D1, D2, D4 и D5, чем можно объяснить сосудорасширяющее действие дофамина в крови [9].

Недавние исследования показали, что денервация ЛА улучшает легочную гемодинамику в экспериментальной модели и в немногочисленных клинических испытаниях [10]. Одним из возможных методов снижения давления в ЛА может являться радиочастотное повреждение иннервирующих сосудов нервных волокон, которые расположены в окружающей жировой клетчатке [11]. Известно, что плотность иннервации наиболее высока в проксимальных отделах ЛА с постепенным уменьшением по направлению к периферии сосудистого русла [12]. Тем не менее размеры, плотность, глубина расположения по отношению к просвету ЛА нервных волокон и ганглиев, равно как экспрессия ими различных рецепторов симпатической, парасимпатической нервной систем и моноаминовых нейромедиаторов у человека, еще плохо изучены.

Цель исследования — морфологическое исследование нервных волокон и ганглиев в периартериальной жировой ткани бифуркации ЛА у пациентов с ЛГ и без нее.

Материалы и методы

Материалом исследования послужила зона бифуркации ЛА с окружающей жировой клетчаткой (рис. 1). Тканевые образцы забирались по всей окружности артерии в виде кольца шириной 1 см (суммарная площадь препарата — 4 см²). Был изучен аутопсийный материал ЛА от 8 пациентов с ЛГ и от 9 пациентов без нее (группа сравнения); проведен анализ историй болезни (табл. 1). Среди умерших больных было 7 женщин 24–78 лет (средний возраст 59 ± 22 лет) и 10 мужчин 20–78 лет (средний возраст 62 ± 15 лет). Образцы ЛА фиксировались в 10-процентном забуференном формалине, после чего по стандартной методике изготавливались микропрепараты, окрашенные гематоксилином и эозином, а также проводилась иммуногистохимическая реакция с антителами к белку S100 (фирмы DAKOCytomation, Дания) для детекции нервных волокон и ганглиев, к tyrosine hydroxylase (ТН; антигену адренергических рецепторов симпатической нервной системы; фирмы Abcam, Великобритания), к мускариновому ацетилхолиновому рецептору М1 парасимпатической нервной системы (фирмы Abnova, Тайвань), к дофаминовым рецепторам D1, D2, D5 (соответственно фирм Thermo и Santa Cruz Biotechnology, США). Морфометрический анализ осуществлялся с помощью анализатора изображения Leica Application Suite V 4.5.0 (Германия) и ImageScope

Color (Россия). Оценивалось количество нервных волокон и ганглиев на площадь препарата (4 см²; плотность распределения), их диаметр и глубина расположения относительно внутренней поверхности интимы ЛА (в мкм). Выраженность экспрессии иммуногистохимических маркеров определялась в баллах (1 балл — слабая экспрессия, 2 — умеренно слабая экспрессия, 3 — умеренная, 4 — выраженная). Оценивалось соотношение клеток нервных структур с экспрессией ТН, D1, D2, D5 и М1 к таковым без экспрессии этих маркеров (в процентах).

Статистический анализ выполнялся с использованием программы IBM SPSS Statistics 19, version 19.0.0. Все переменные выражены как среднее ± стандартное отклонение или в виде абсолютных значений и процентов. Для проверки гипотезы сходности средних значений выборок с распределением Гаусса использовался t-критерий Стьюдента. Для сравнения групп с распределением, отличным от Гауссовского, использовался критерий Манна–Уитни или точный тест Фишера. Для оценки корреляции данных использовался линейный коэффициент корреляции Пирсона или коэффициент корреляции Спирмена, в зависимости от типа распределения массива данных. При оценке различий параметров между группами статистически значимым считалось значение $p < 0,05$.

Таблица 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

№	Пол	Возраст	Наличие ЛГ	Стадия ХСН	Наличие СД	Основной диагноз	Наличие ТЭЛА
1	Ж	55	1	4	0	ВПС: двустворчатый аортальный клапан	0
2	М	20	1	4	0	ВПС: синдром Эйзенменгера	1
3	М	68	1	4	0	ИБС	0
4	М	54	0	2	0	ХЦВБ, ГБ	0
5	М	66	0	2	0	ХЦВБ	0
6	Ж	78	0	2	0	ИБС	0
7	М	78	0		1	ИБС	1
8	М	70	0	3	1	ИБС	0
9	М	57	0	2	0	ИБС	0
10	Ж	77	0	3	0	Аортальный стеноз, ГБ	0
11	М	62	1	3	0	Ревматический порок сердца	0
12	М	66	0	2	0	ГБ, ХЦВБ, ОНМК	
13	Ж	73	0	2	1	ГБ, ХЦВБ, ОНМК	0
14	Ж	77	1	4	0	Ревматический порок сердца, ИБС, ГБ	0
15	М	72	1	3	0	ИБС, ГБ	0
16	Ж	24	1	3	0	ВПС: синдром Эйзенменгера	1
17	Ж	28	1	3	0	Первичная ЛГ	0

Примечание: ЛГ — легочная гипертензия; ХСН — хроническая сердечная недостаточность; СД — сахарный диабет; ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии; ВПС — врожденный порок сердца; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ХЦВБ — хроническая цереброваскулярная болезнь; ГБ — гипертоническая болезнь; ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения.

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Результаты

Средний уровень расчетного систолического давления в ЛА в группе пациентов с ЛГ составлял $64,5 \pm 8,5$ против $36 \pm 14,8$ мм рт. ст. в группе без ЛГ ($p = 0,0001$). Пациенты с ЛГ не различались по полу, возрасту, однако тяжесть хронической сердечной недостаточности (ХСН) имела прямую связь с уровнем расчетного систолического давления в ЛА (II функциональный класс (ФК) — $39,7 \pm 17,6$ против III ФК — $45 \pm 14,8$ против IV ФК ХСН — $70,2 \pm 8,7$ мм рт. ст. соответственно, $p = 0,01$).

Нервные волокна и ганглии располагались в жировой клетчатке, а в одном из 20 случаев (в 5%; без ЛГ) нервные волокна были обнаружены непосредственно в адвентиции ЛА (рис. 2 А, Б). Еще в одном случае (в 5%; без ЛГ) в препарате был обнаружен нервный ствол длиной 1,1 см (рис. 3 А). Наиболее крупный нервный ганглий был размером 3000 мкм.

Статистически значимых различий в строении и размерах нервных волокон и ганглиев в группе с ЛГ и группе сравнения выявлено не было. Половые различия не оказывали влияния на характеристику нервных элементов ЛА. В целом среднее количество нервных волокон на площадь препарата (4 см^2) было $29,1 \pm 15,5$; ганглиев — $1,1 \pm 1,3$; средний диаметр волокон составил $130,6 \pm 35,1$ мкм, ганглиев — $532,0 \pm 790,7$ мкм; среднее расстояние волокно–интима $2141,4 \pm 663,3$ мкм, ганглий–интима — $1799,0 \pm 500,5$ мкм (табл. 2). Отмечено, что плотность волокон вокруг бифуркации ЛА выше ($p = 0,04$) у пациентов с ХСН II ФК (20 ± 10 волокон/ 4 см^2) по сравнению с пациентами с ХСН III–IV ФК (11 ± 4 волокон/ 4 см^2). Была обнаружена тенденция уменьшения диаметра нервных волокон и ганглиев с возрастом ($r = -0,45$; $p = 0,06$), а также расстояния волокно–интима ($r = -0,43$; $p = 0,08$).

Иммуногистохимическое исследование с М1 показало, что экспрессия этого ацетилхолинэргического рецептора определяется во всех клетках нервных волокон и ганглиев, в эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА и сосудов периартериальной жи-

Таблица 2
МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН И ГАНГЛИЕВ С ОЦЕНКОЙ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

№/Наличие ЛГ	Количество НВ	Количество НГ	Средний диаметр НВ (мкм)	Средний диаметр НГ (мкм)	Средний диаметр НГ (мкм)	Расстояние интима–НВ (мкм)	Расстояние интима–НГ (мкм)	Экспрессия М1 в баллах / % клеток НВ и НГ с экспрессией	Экспрессия ТН в баллах / % клеток НВ и НГ с экспрессией	Экспрессия D1 в баллах	Экспрессия D5 в баллах
1/ЛГ	50	1	189	300	2241	2003	4/100	4/60	1–2	4	
2/ЛГ	21	1	142	176	1050	1050	4/100	4/66	1–2	4	
3/ЛГ	50	1	142	210	2488	1650	4/100	1/94	1–2	4	
4	25	0	137	–	3435	–	4/100	4/94	1–2	4	
5	6	0	167	–	2229	–	4/100	4/89	1–2	4	
6	28	0	98	–	1887	–	4/100	4/66	1–2	4	
7	45	2	126	284	1788	2955	4/100	4/84	1–2	4	
8	19	5	157	420	1431	1693	4/100	4/92	1–2	4	
9	30	1	135	250	1615	2159	4/100	4/80	1–2	4	
10	12	0	98	–	1795	–	4/100	4/73	1–2	4	
11/ЛГ	34	2	175	182	1893	1906	4/100	1/97	1–2	4	
12	36	3	127	621	2070	1193	4/100	4/87	1–2	4	
13	14	2	133	250	1588	1676	4/100	1/77	1–2	4	

Примечание: ЛГ — легочная гипертензия; НВ — нервное волокно; НГ — нервный ганглий.

Рисунок 1.
Схема вырезки зоны
бифуркации легочной артерии

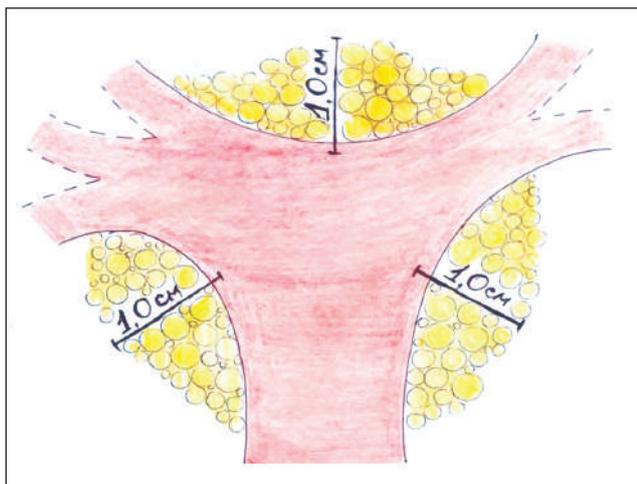


Рисунок 3. Нервный ствол (обведен кружком)
в периартериальной жировой клетчатке;
гематоксилин и эозин; × 50.

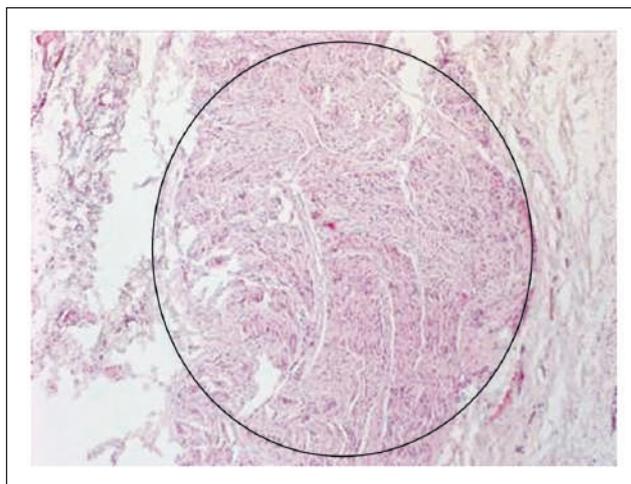
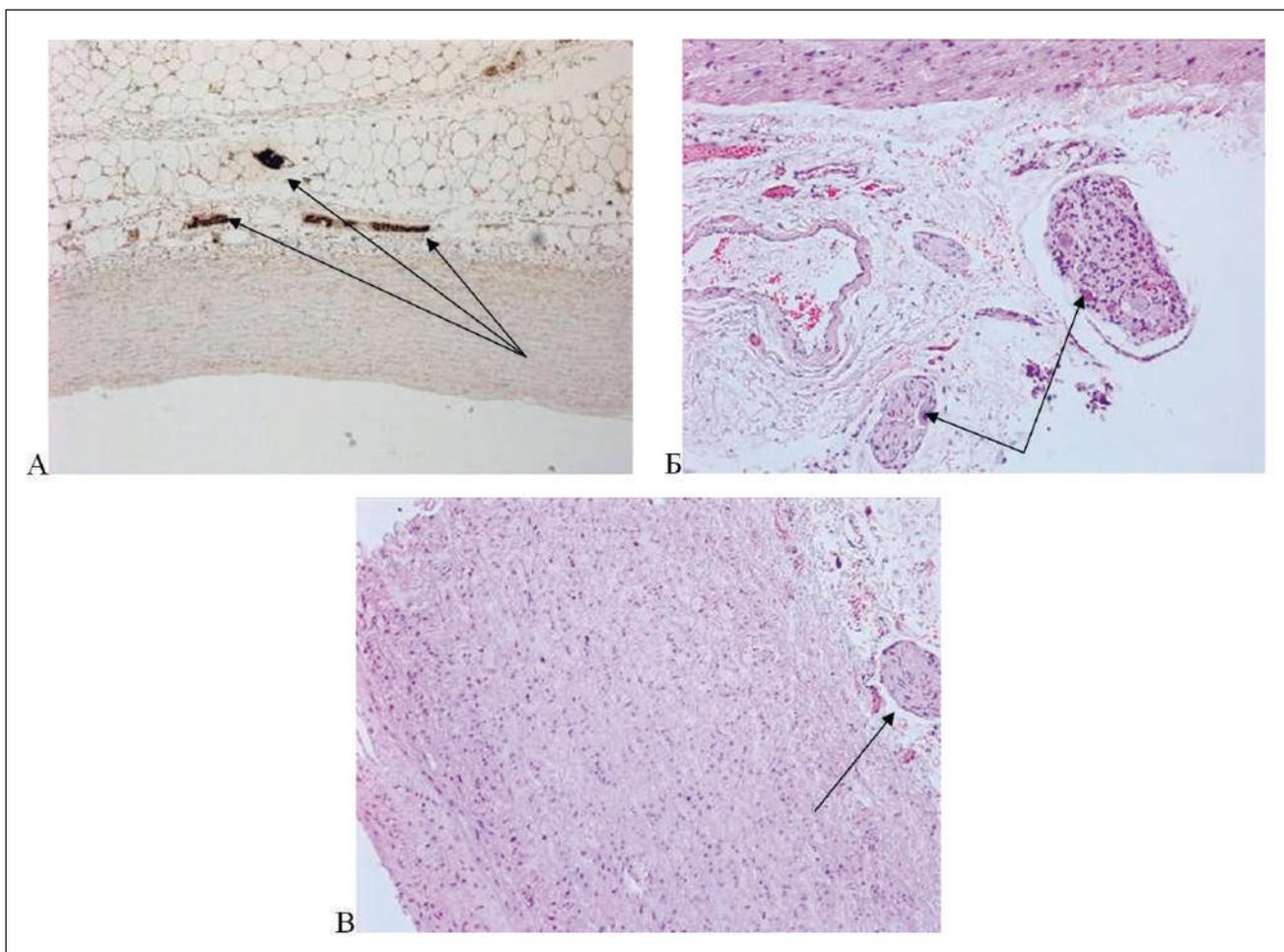


Рисунок 2. Нервные волокна и ганглии в зоне бифуркации легочной артерии

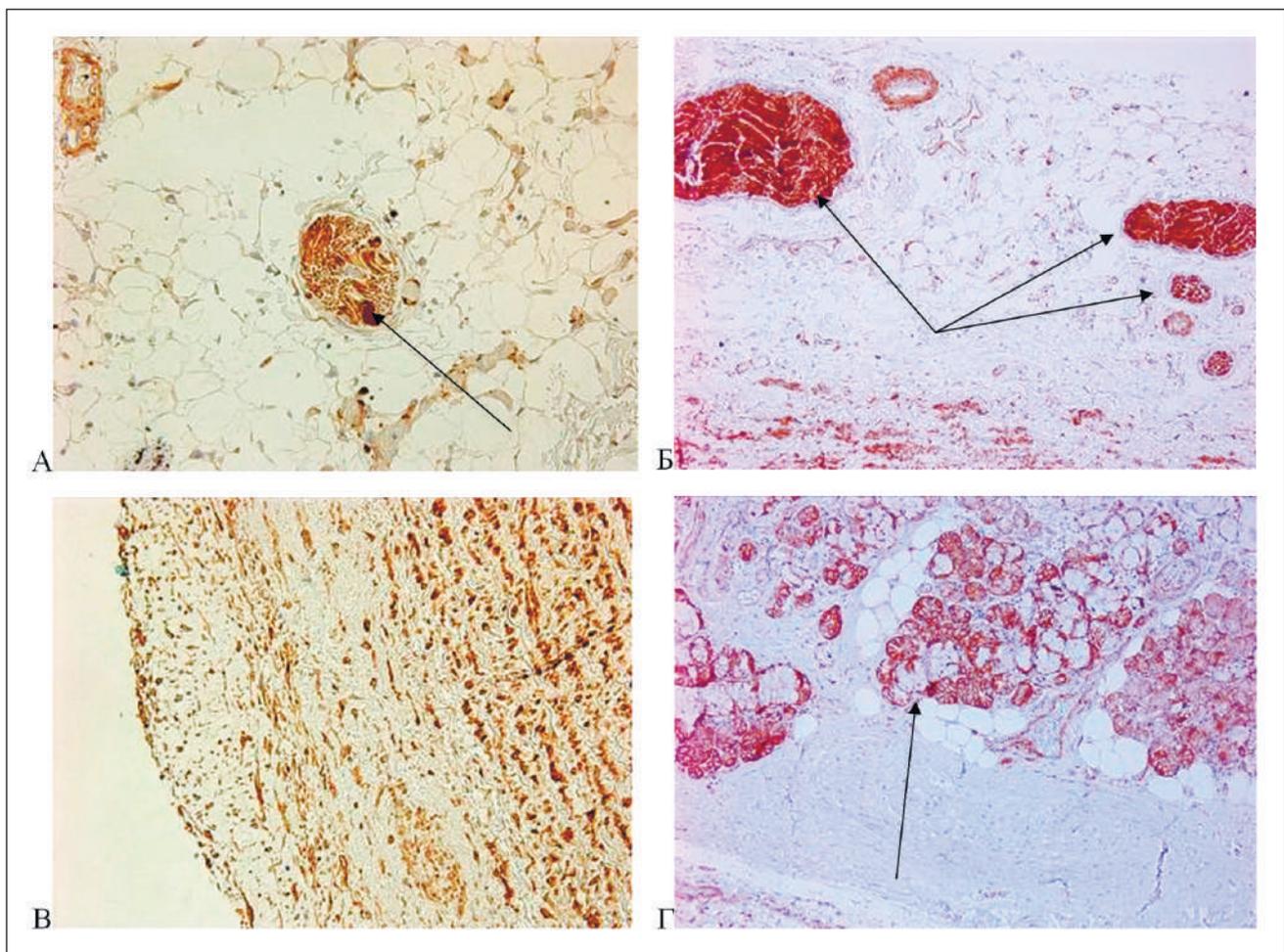


Примечание: А: Нервные волокна в жировой клетчатке. Экспрессия S100. Темно-коричневое окрашивание нервных волокон (указаны стрелками); × 50. Б: Нервные ганглии в жировой клетчатке (указаны стрелками); гематоксилин и эозин; × 200. В: Нервное волокно в адвентиции легочной артерии (указано стрелкой); гематоксилин и эозин; × 100.

ровой клетчатки, а также в реснитчатом эпителии бронхов и бронхиальных железах (рис. 4 А, Б, В). Выраженность экспрессии M1 на всех структурах и во всех случаях была 4 балла. Во всех 8 случаях

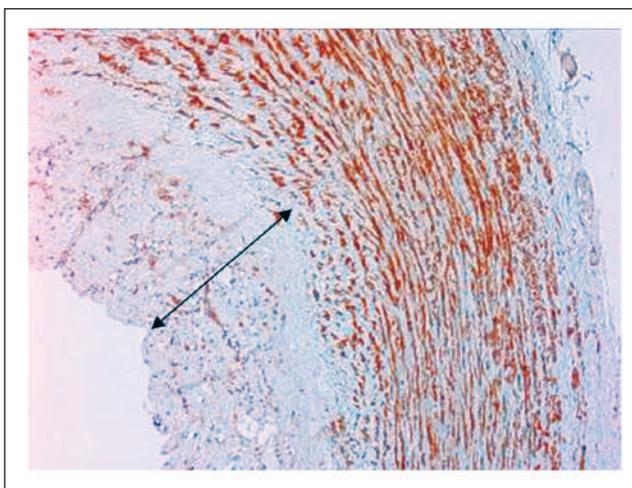
ЛГ экспрессии этого рецептора не наблюдалось на протяжении 1/3–1/2 толщины стенки ЛА из-за замещения гладкомышечных клеток фиброзной тканью, макрофагами, кристаллами холестерина

Рисунок 4. Экспрессия М1-мускаринового рецептора (коричневое окрашивание)



Примечание: А — на специализированных клетках нервного ганглия (указано стрелкой); Б — в нервных волокнах (указаны стрелками); В — на клетках стенки легочной артерии; Г — на клетках слизистых желез стенки бронха (указано стрелкой); × 100.

Рисунок 5.
Отсутствие экспрессии М1-мускаринового рецептора в зоне атеросклеротических изменений легочной артерии (указано); × 50

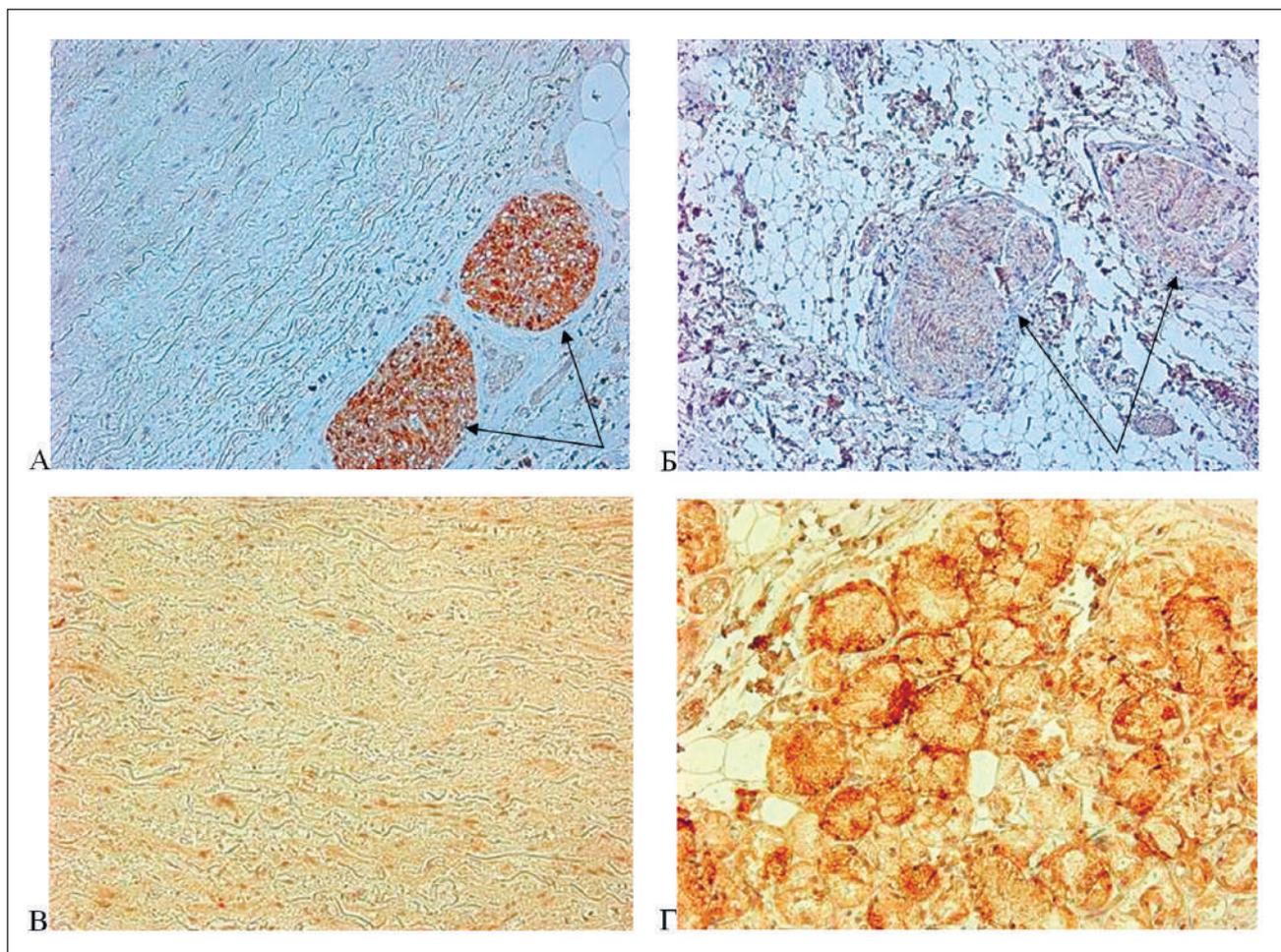


и другими морфологическими атрибутами атеросклероза (рис. 5).

Иммуногистохимическое исследование с ТН показало, что экспрессия этого маркера симпатической нервной системы также определялась на эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА, нервных волокнах и ганглиях, в эпителии бронхиальных желез и реснитчатом эпителии выстилки бронхов, но в отличие от М1 ее выраженность на клетках ЛА была 1–2 балла (во всех случаях), на эпителии бронхов — 3–4 балла (во всех случаях), а на нервных волокнах и нервных ганглиях — от 1 до 4 баллов (рис. 6 А, Б, В, Г).

Слабая экспрессия — 1 балл — была выявлена в 33 % случаев с ЛГ и в 11 % случаев без ЛГ. Кроме того, не все нервные клетки экспрессировали ТН, в отличие от М1. В частности, в группе ЛГ в среднем только $66,0 \pm 27,1$ клеток нервных волокон и ганглиев экспрессировали ТН, тогда как в группе сравнения — $82,4 \pm 8,7$ клеток (рис. 7 А, Б). Тем не менее статистически значимых различий между группами выявлено не было. В случае первичной ЛГ экспрессия ТН не только была слабо выражена

Рисунок 6. Экспрессия TH — маркера симпатической нервной системы (коричневое окрашивание)



Примечание: А — на нервных волокнах в адвентиции легочной артерии (указаны стрелками); Б — слабая экспрессия (1 балл) на нервных волокнах в жировой клетчатке (указаны стрелками); В — умеренно слабая экспрессия маркера (2 балла) на гладкомышечных клетках легочной артерии; Г — экспрессия 4 балла в эпителиальных клетках желез стенки бронха; $\times 200$.

(1 балл), но и наблюдалась только в 18% нервных клеток волокон.

В целом экспрессия этого маркера симпатической нервной системы на нервных волокнах и ганглиях была меньше выражена по сравнению с М1.

Экспрессии дофаминовых рецепторов в специализированных клетках нервных волокон и ганглиев не было обнаружено. Экспрессия D1 выявлялась на эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА, но ее выраженность оценивалась в 1–2 балла вне зависимости от наличия или отсутствия ЛГ. Экспрессии D2 в стенке ЛА мы не обнаружили, тогда как уровень экспрессии D5 на гладкомышечных клетках и эндотелии ЛА, сосудах жировой клетчатки и сосудах нервных структур во всех 17 случаях составил 4 балла. Экспрессия D5 отмечалась также на оболочках нервных волокон и ганглиев (рис. 8 А, Б).

Обсуждение

В результате нашего исследования было выявлено, что нервные волокна и ганглии у подавляющего

большинства пациентов располагаются в жировой клетчатке, но в 5% случаев их можно обнаружить и в адвентиции ЛА. Наши данные совпадают с результатами Y. Huang и соавторов (2019), продемонстрировавших многочисленные нервные структуры в жировой и соединительной тканях вокруг ЛА у человека и крысы [13], и отличаются от результатов Y. Zhang и соавторов (2016), которые считают, что нервные волокна и ганглии у собак располагаются именно в адвентиции сосуда [14]. В отличие от последних авторов, у людей мы наблюдали экспрессию симпатической TH и ацетилхолинового M1-рецептора в одних и тех же нервных волокнах и ганглиях. В нашем исследовании среднее расстояние волокно–интима $2141,4 \pm 663,3$ мкм, ганглий–интима — $1799,0 \pm 500,5$ мкм, что соответствует удаленности нервных элементов от просвета сосуда у собак: по данным Y. Zhang и соавторов (2016) — от 1 до 3 мм [14], по данным L. Zhou и соавторов (2015) — от 823 до 4148 мкм [15].

Рисунок 7. Экспрессия TH — маркера симпатической нервной системы (коричневое окрашивание) не на всех клетках нервных волокон и ганглиев (указаны стрелками); × 100, 200

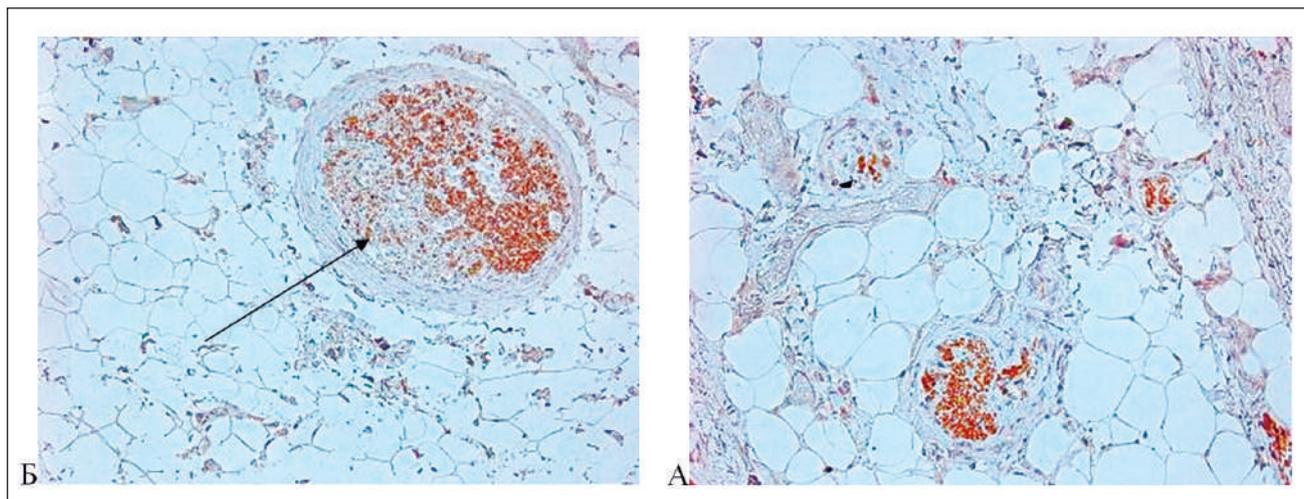
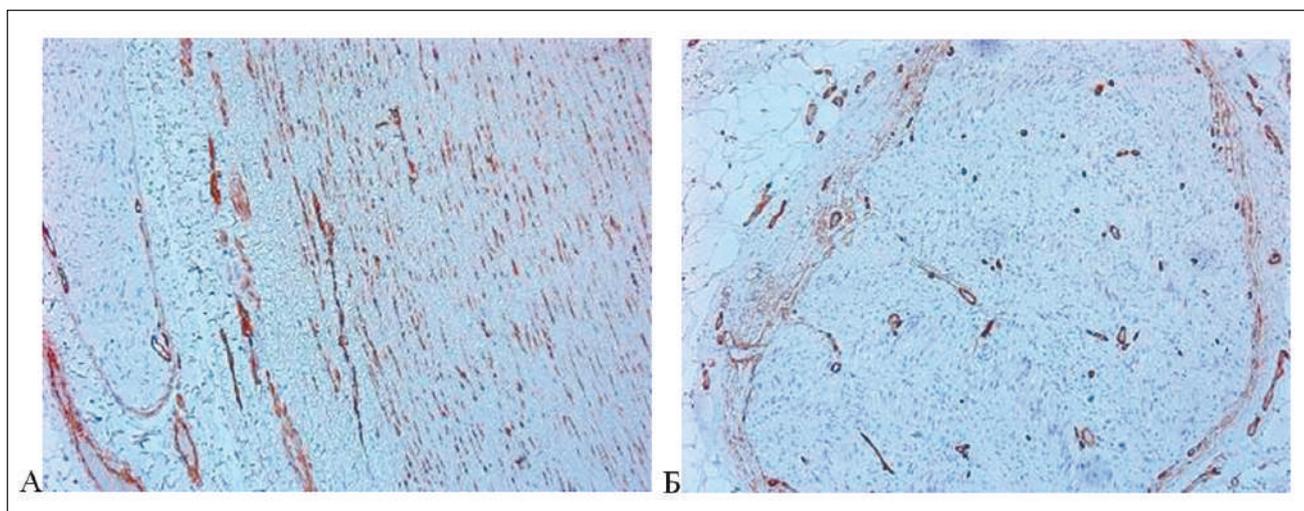


Рисунок 8. Экспрессия D5-дофаминового рецептора (коричневое окрашивание)



Примечание: А — на гладкомышечных клетках легочной артерии, сосудов и оболочке нервного волокна; Б — на оболочке и сосудах нервного волокна; × 100, × 200.

На наш взгляд логично, что статистически значимых различий в строении и размерах нервных волокон и ганглиев в группе с ЛГ и группе сравнения выявлено не было, равно как и факт, что половые различия не оказывают влияния на характеристику нервных элементов ЛА. Представляет интерес и значимое снижение плотности волокон вокруг бифуркации ЛА по мере прогрессирования ХСН. Аналогичные изменения при ХСН описывают в нервных волокнах сердца с параллельным снижением их функции [16]. В нашем исследовании также была отмечена тенденция уменьшения размеров нервных волокон с возрастом. Аналогичные изменения в виде атрофии и демиелинизации периферических нервных волокон у пациентов пожилого и старческого возраста наблюдали E. Verdú и соавторы (2000) [17].

В нашем исследовании была выявлена выраженная экспрессия ацетилхолинергического муска-

ринового рецептора M1 не только во всех клетках всех нервных элементов, но в стенке ЛА, бронхиальном эпителии и бронхиальных железах, выделяющих слизь. Этот факт полностью соответствует работам других авторов [18, 19], которые, в частности, продемонстрировали роль M1 и M3-рецептора в ацетилхолин-индуцированной релаксации ЛА человека, предполагая их локализацию в эндотелиоцитах. Механизм, вовлеченный в релаксацию, по мнению последних авторов, зависит от метаболитов циклооксигеназы и NO-синтазного пути образования оксида азота. Они предполагают, что ацетилхолин-индуцированная релаксация опосредована активацией M3-рецепторов, расположенных на гладких мышцах сосудов. Роль M1-рецептора остается до конца не выясненной. Тем не менее созданы препараты-антагонисты, которые нацелены на M1, M2, M3-рецепторы, которые используются

для лечения нескольких заболеваний легких, в том числе астмы и хронических обструктивных заболеваний легких [20].

Основная роль легких — газообмен, но они также служат и барьером — защитой против патогенов из загрязненной окружающей среды. Ацетилхолин производят как нейрональные, так и ненейрональные источники, действуя через мускариновые рецепторы, чтобы регулировать эти важные физиологические функции. Ацетилхолин сокращает гладкую мышцу дыхательных путей с целью тонизировать и регулировать их проходимость. В кровеносных сосудах ацетилхолин вызывает расслабление гладких мышц и расширение их просвета. В слизистых железах и эпителиальных клетках бронхиальной выстилки ацетилхолин регулирует секрецию слизи и, благодаря частоте биения ресничек, клиренс слизи. Ацетилхолин также модулирует воспаление. Эпителиальные клетки дыхательных путей содержат и выделяют ацетилхолин, равно как и эндотелиоциты сосудов [21–23]. В то время как нейрональный ацетилхолин не способствует восстановлению тонуса в легочных кровеносных сосудах, стимуляция блуждающих нервов вызывает вазодилатацию [24]. Тем не менее экзогенный ацетилхолин будет расслаблять предварительно сокращенные ЛА человека, если эндотелий не поврежден [25]. Ацетилхолин, вероятно, действует на мускариновые рецепторы на эндотелиальных клетках, стимулируя выработку оксида азота, который расслабляет гладкую мускулатуру [26]. Кроме того, как показано в нашей работе, M1-рецепторы есть и на самих гладкомышечных клетках.

Наше исследование показало, что, независимо от наличия или отсутствия ЛГ, экспрессия ТН симпатической нервной системы на нервных волокнах и ганглиях была меньше выражена по сравнению с M1 парасимпатической нервной системы, что противоречит мнению P. J. Barnes и S. F. Liu (1995), которые считают, что, хотя плотность иннервации может существенно различаться у разных видов, общая адренергическая иннервация более обширна, чем холинергическая [27]. С другой стороны, результаты нашего исследования полностью соответствуют работам других авторов [28, 29], которые, как и мы, описывают адренергические рецепторы на эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА, бронхиальном эпителии, бронхиальных железах, нервных волокнах и ганглиях вокруг артерии.

Иммуногистохимическое исследование дофаминовых рецепторов выявило преимущественную экспрессию D5-рецептора вне зависимости от наличия или отсутствия ЛГ, тогда как D2-рецептор в наших случаях не экспрессировался, а экспрессия

D1 была слабо выражена. Дофаминовые рецепторы экспрессировались только на сосудистых стенках, в том числе на гладкомышечных клетках и эндотелии, в сосудах нервных структур, но не в нервных клетках. A. Ricci и соавторы (2006) полагают, что дофамин индуцирует вазорелаксацию ЛА, главным образом, через эндотелий-зависимый механизм, но подтипы дофаминовых рецепторов, вовлеченные в этот механизм, еще не идентифицированы [30]. Описывают гетерогенное распределение и плотность подтипов дофаминовых рецепторов вдоль дерева ЛА человека, что, возможно, связано с различными функциональными ролями дофамина на различных уровнях легочной циркуляции. D1 -и, в меньшей степени, D5-рецепторы располагаются, по данным A. Ricci и соавторов (2006), преимущественно в эндотелии внелегочных ветвей ЛА [30], тогда как в нашем исследовании они экспрессировались не только в эндотелиоцитах, но и в гладкомышечных клетках ЛА. Y. Kobayashi и соавторы (1995) также наблюдали эти рецепторы в меди ЛА [31].

Хотя катетерная абляция ЛА с целью денервации выполняется редко и до сих пор считается экспериментальной, становится очевидным, что интервенционные кардиологи играют все более заметную роль в лечении больных ЛГ. При этом принятие решений о способе лечения заболевания обычно осуществляет многопрофильная кардиопульмональная бригада, а сама процедура выполняется только в центрах с опытом проведения подобных операций [32]. Несмотря на то, что накоплен достаточный клинический опыт [33], необходимо заложить морфологическую основу, убеждающую в целесообразности данного метода лечения ЛГ. В этом отношении настоящее исследование позволяет предположить, что в ходе катетерной радиочастотной денервации происходит ликвидация не только симпатических и парасимпатических рецепторов нервных ганглиев и волокон, но прежде всего, адренергических, ацетилхолинергических и дофаминовых рецепторов стенки самой ЛА.

Заключение

В результате исследования периаартериальной жировой клетчатки зоны бифуркации ЛА не было выявлено различий по плотности распределения и диаметру нервных волокон и ганглиев между пациентами с ЛГ и без нее. Отмечалось значимое снижение количества нервных волокон по мере прогрессирования сердечной недостаточности. Экспрессия tyrosine hydroxylase — маркера симпатической нервной системы на нервных волокнах и ганглиях — была менее выражена

и наблюдалась не на всех клетках по сравнению с М1-мускариновым рецептором парасимпатической нервной системы. Экспрессия дофаминовых рецепторов D1 и D5 была выявлена только на эндотелии и гладкомышечных клетках ЛА. Дальнейшее морфологическое исследование на большем материале позволит создать теоретическую базу обоснованности интервенционной денервации ЛА при фармакологически резистентной ЛГ.

Благодарности / Acknowledgements

Авторы благодарят медицинского лабораторного техника Викторию Геннадьевну Миренбург за изготовление гистологических и иммуногистохимических препаратов и ординатора 1-го года обучения Елену Григорьевну Кошевую за художественное оформление рисунков. / We thank the Laboratory Assistant Viktoriya Mirenburg for preparing histology and immunohistochemistry specimens, as well as the Postgraduate Student Elena Koshevaya for drawing the images.

Финансирование / Financial support

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, проект № 18–315–20050. / The study is supported by the grant of the Russian Research Fundamental Foundation, the project № 18–315–20050.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Galiè N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC et al. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25):60–72. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.031
- Mak S, Witte KK, Al-Hesayen A, Granton JJ, Parker JD. Cardiac sympathetic activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302(10):1153–1157. doi:10.1152/ajpregu.00652.2011
- de Man FS, Tu L, Handoko ML, Rain S, Ruiter G, François C et al. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(8):780–789.
- Guidotti TL. The lung: scientific foundations. *J Am Med Assoc.* 1997;278(23):2117. doi:10.1001/jama.1997.03550230093050
- Juratsch CE, Jengo JA, Castagna J, Laks MM. Experimental pulmonary hypertension produced by surgical and chemical denervation of the pulmonary vasculature. *Chest.* 1980;77(4):525–530.
- Barthélémy P, Sabeur G, Jammes Y. Assessment of an airway-to-pulmonary circulation reflex in cats. *Neurosci Lett.* 1996;211(2):89–92.
- Szidon JP, Flint JF. Significance of sympathetic innervation of pulmonary vessels in response to acute hypoxia. *J Appl Physiol.* 1977;43(1):65–71.
- McMahon TJ, Hood JS, Kadowitz PJ. Pulmonary vasodilator response to vagal stimulation is blocked by N omega-nitro-L-arginine methyl ester in the cat. *Circ Res.* 1992;70(2):364–369.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):182–217. doi:10.1124/pr.110.002642
- Chen SL, Zhang YJ, Zhou L, Xie DJ, Zhang FF, Jia HB et al. Percutaneous pulmonary artery denervation completely abolishes experimental pulmonary arterial hypertension in vivo. *EuroIntervention.* 2013;9(2):269–276.
- Chen SL, Zhang FF, Xu J, Xie DJ, Zhou L, Nguyen T et al. Pulmonary artery denervation to treat pulmonary arterial hypertension: the single-center, prospective, first-in-man PADN-1 study (first-in-man pulmonary artery denervation for treatment of pulmonary artery hypertension). *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(12):1092–1100. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.075
- Fisher AWF. The intrinsic innervation of the pulmonary vessels. *Acta Anat (Basel).* 1965;60(4):481–496.
- Huang Y, Liu YW, Pan HZ, Zhang XL. Transthoracic pulmonary artery denervation for pulmonary arterial hypertension sympathetic nerve distribution and pulmonary artery remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39:704–718. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311992
- Zhang Y, Chen W, Xu Y, Liu H, Chen Y, Yang H et al. Nerve distribution of canine pulmonary arteries and potential clinical implications. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):365–374.
- Zhou L, Zhang J, Jiang XM, Xie DJ, Wang JS, Li L et al. Pulmonary artery denervation attenuates pulmonary arterial remodeling in dogs with pulmonary arterial hypertension induced by dehydrogenized monocrotaline. *J Am Coll Cardiol Intv.* 2015;8(15):2013–2023. doi:10.1016/j.jcin.2015.09.015
- Regitz V, Leuchs B, Bossaller C, Sehested J, Rappolder M, Fleck E. Myocardial catecholamine concentrations in dilated cardiomyopathy and heart failure of different origins. *Eur Heart J.* 1991;12(suppl.D):171–174.
- Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 2000;5(4):191–208.
- Norel X, Walch L, Costantino M, Labat C, Gorenne I, Dulmet E et al. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 1996;119(1):149–157.
- Giang M, Papamatheakis DG, Nguyen D, Paez R, Blum Johnston C, Kim J et al. Muscarinic receptor activation affects pulmonary artery contractility in sheep: the impact of maturation and chronic hypoxia on endothelium-dependent and endothelium-independent function. *High Alt Med Biol.* 2016;17(2):122–132. doi:10.1089/ham.2015.0116
- Buels KS, Fryer AD. Muscarinic receptor antagonists: effects on pulmonary function. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;208:317–341. doi:10.1007/978-3-642-23274-9_14
- Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J et al. Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology.* 2004;145(5):2498–2506.
- Haberberger R, Schemann M, Sann H, Kummer W. Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. *J Appl Physiol.* 1997;82(2):426–434.
- Haberberger RV, Bodenbenner M, Kummer W. Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 2000;113(5):379–387.
- Laitinen LA, Laitinen MV, Widdicombe JG. Parasympathetic nervous control of tracheal vascular resistance in the dog. *J Physiol.* 1987;385:135–146.
- Greenberg B, Rhoden K, Barnes PJ. Endothelium-dependent relaxation of human pulmonary arteries. *Am J Physiol.* 1987;252(2Pt2):434–438.

26. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373–376.
27. Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev*. 1995;47(1):87–131.
28. Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Bégueret H, Bellance N, Banquet S et al. Beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 2008;77(1):202–210. Epub 2007 Aug 30.
29. Barnes PJ. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(4):345–351. doi:10.1513/pats.200409-045MS
30. Ricci A, Mignini F, Tomassoni D, Amenta F. Dopamine receptor subtypes in the human pulmonary arterial tree. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006;26(4):361–369.
31. Kobayashi Y, Ricci A, Amenta F, Cavallotti C, Hattori K. Localization of dopamine receptors in the rabbit lung vasculature. *J Vasc Res*. 1995;32(3):200–206.
32. Rothman A, Arnold ND, Chang W, Watson O, Swift AJ et al. Pulmonary artery denervation reduces pulmonary artery pressure and induces histological changes in an acute porcine model of pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015;8(11):e002569. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002569
33. Chen SLZH, Xie DJ, Zhang J, Zhou L, Rothman AK, Stone GW. Hemodynamic, functional, and clinical responses to pulmonary artery denervation in patients with pulmonary arterial hypertension of different etiologies: phase II results from the PADN-1 study. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015;8:e002837.

Информация об авторах

Митрофанова Любовь Борисовна — доктор медицинских наук, руководитель службы морфологической диагностики, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патоморфологии, доцент, профессор кафедры патологии ФГБУ «НМИЦ им В. А. Алмазова» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-0735-7822;

Перминова Анастасия Аркадьевна — ординатор 2-го года кафедры патологии ФГБУ «НМИЦ им В. А. Алмазова» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-1946-0029;

Гончарова Наталья Сергеевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории кардиомиопатий научно-исследовательского отдела «Некоронарогенные заболевания сердца», доцент кафедры кардиологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. ORCID: 0000-0001-6954-7096;

Михайлов Евгений Николаевич — доктор медицинских наук, доцент, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории нейромодуляции научно-исследовательского отдела аритмологии, профессор кафедры сердечно-сосудистой хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-6553-9141.

Author information

Lyubov B. Mitrofanova, MD, PhD, DSc, Head, Morphological Diagnostics Service, Chief Researcher, Scientific Research Laboratory of Pathomorphology, Associate Professor and Professor, Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre; ORCID: 0000-0003-0735-7822;

Anastasia A. Perminova, MD, Resident of the 2nd year, Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre; ORCID: 0000-0002-1946-0029;

Natalya S. Goncharova, MD, PhD, Senior Researcher, Scientific Research Laboratory of Cardiomyopathy, Scientific Research Department “Non-coronary heart diseases”, Associate

Professor, Department of Cardiology, Almazov National Medical Research Centre; ORCID: 0000-0001-6954-7096;

Evgeny N. Mikhaylov, MD, PhD, DSc, Associate Professor, Chief Researcher, Scientific Research Laboratory of Neuromodulation, Scientific Research Department of Arrhythmology, Professor, Department of Cardiovascular Surgery, Almazov National Medical Research Centre; ORCID: 0000-0002-6553-9