

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 611.8:611.24:599.323.4

*Е. И. Чумасов, П. А. Ворончихин и Д. Э. Коржевский*

## ЭФФЕРЕНТНАЯ ИННЕРВАЦИЯ СОСУДОВ И БРОНХОВ ЛЕГКОГО КРЫСЫ (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии; ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

В работе изучены особенности иннервации бронхов и кровеносных сосудов легкого крысы ( $n=20$ ) с помощью иммуногистохимических реакции на синаптофизин и  $\alpha$ -актин. Результаты исследования показали, что наиболее интенсивная иннервация характерна для стенки бронхов и, в частности, для мышечной пластинки слизистой оболочки. Синаптофизин-положительные терминалы (СФПТ) выявлены в бронхах в тесной связи с циркулярными пучками гладких миоцитов и микроганглиями. Густая сеть СФПТ обнаружена в легочной вене — в ее средней оболочке, образованной кардиомиоцитами. В отличие от бронхов и легочной вены крупные ветви легочной артерии не содержат СФПТ. В работе кратко обсуждается вопрос о природе нервных волокон и их функции, и сделано предположение, что СФПТ образованы эфферентными волокнами (аксонами) нейронов, идущими от интрапюльмональных парасимпатических ганглиев.

**Ключевые слова:** легкое, бронхи, кровеносные сосуды, иннервация, синаптофизин

Вопросы об источниках иннервации, топографии, биохимическом статусе нервных волокон и ганглиев, определении их функции в различных отделах легких у животных и человека являются актуальными как для нейрогистологов, фармакологов, так и для клиницистов. До сих пор не выяснена роль нервной системы при сердечно-легочной гипертензии, вызывающей внезапную детскую смерть, не определена доля участия нервных аппаратов при бронхолегочных заболеваниях, в том числе бронхиальной астме. Значительный вклад в решение некоторых нейроморфологических задач в последние десятилетия вносят работы, выполненные с использованием современных иммуногистохимических методов [10]. С их помощью в сочетании с конфокальной микроскопией были получены ценные данные о развитии нервных аппаратов и гладкой мышечной ткани воздухоносных путей у животных и человека в эмбриогенезе [7–9].

Цель настоящего исследования — изучение эфферентной иннервации сосудистого русла и внутрилегочного отдела бронхиального дерева у крысы.

Материал и методы. Объектом исследования служили 20 половозрелых крыс-самцов линии Вистар, массой 190–240 г. Содержание и умерщвление животных осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г.

МЗ СССР). Легкое с легочными венами (ЛВ) и артериями фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [1] и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин. Морфологическому исследованию подвергали срезы легкого, проходящие через ворота органа. Иммуногистохимическое выявление синаптофизина (СФ), который является маркером синаптических пузырьков, характерных для эфферентных нервных окончаний, проводили при помощи поликлональных кроличьих антител (Dako, Дания; Monosan, Нидерланды), в качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США). Белок  $\alpha$ -актин, характерный для гладких миоцитов (ГМ), определяли при помощи мышинных моноклональных антител (клон 1A4) (Dako, Дания), в качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Envision+System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю, а также гематоксилином — эозином. Диаметр бронхов и бронхиол измеряли с использованием программы LAS EZ (Leica, Германия).

Результаты исследования. В легком у крысы хорошо развита так называемая бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань. Она локализуется преимущественно в слизистой оболочке и в виде непрерывного футляра окружает средние и мелкие внутридольковые бронхи. Легочная артерия и ее ветви следуют обычно параллельно и в тесном контакте с бронхиальным деревом, располагаясь по одну сторону от бронха, в то время

### Сведения об авторах:

*Чумасов Евгений Иванович, Ворончихин Павел Алексеевич, Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

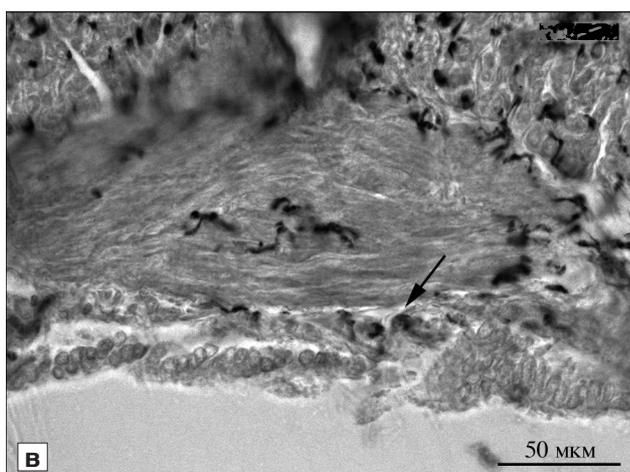
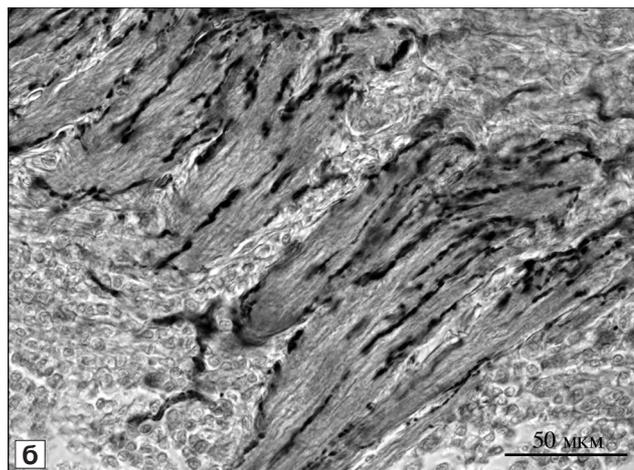
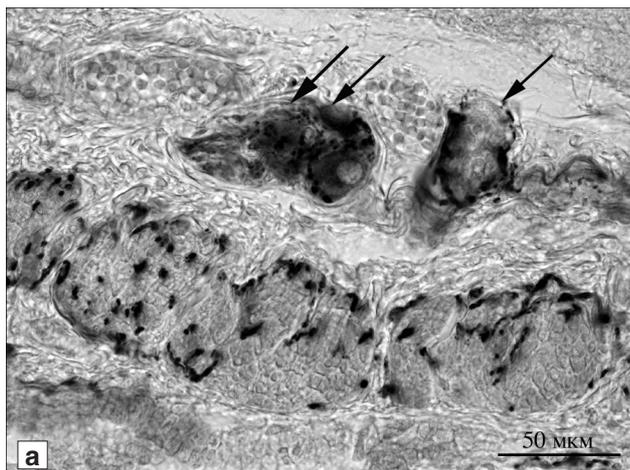


Рис. 1. Синаптофизин-положительные терминалы (СФПТ) в стенке бронха крысы.

а — в адвентиции видна артериола (стрелка) и группа парасимпатических нейронов (две стрелки); б — СФПТ в мышечной пластинке слизистой оболочки бронха; в — СФПТ в собственной пластинке слизистой оболочки бронха (стрелка). Иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин без подкраски.

как легочная вена находится с противоположной стороны и на некотором отдалении.

С помощью окраски толуидиновым синим по Нислю и иммуногистохимической реакции на СФ в области корня легкого выявляются несколько крупных нервных стволиков, которые вместе с сосудами и долевым бронхом входят внутрь органа. Эти нервные проводники образуют вокруг бронхов и сосудов нервные сплетения. Наиболее густые нервные сплетения окружают бронхи. Самое поверхностное — адвентициальное, широкопетлистое сплетение, состоит из крупных нервных стволов и ганглиев. Оно переходит в более глубокое, узкопетлистое сплетение из тонких нервных пучков и микроганглиев, залегающее в перибронхиальной волокнистой соединительной и лимфоидной ткани; в состав этих двух сплетений входят в основном миелиновые и безмиелиновые нервные волокна. Третье — терминальное сплетение безмиелиновых аксонов, теснейшим образом связанных с мышечной пластинкой слизистой оболочки бронхов, представляет наибольший интерес для исследователей.

Характерной особенностью мышечной пластинки внутрилегочных бронхов является необычное расположение и строение ее ГМ, что

хорошо определяется при их реакции на  $\alpha$ -актин. Толстые пучки, состоящие из очень плотно расположенных ГМ, в виде обручей или лентообразных колец окружают просвет бронхов. При этом между соседними пучками ГМ имеются анастомозы. Концентрические и продольные пучки ГМ отчетливо выделяются своей окраской на фоне массы лимфоидной ткани. Концентрическое расположение пучков ГМ характерно в основном для бронхиальных ветвей большого диаметра (350–150 мкм). В респираторных бронхиолах ГМ, как правило, расположены продольно.

Реакция на СФ показала, что концентрические и продольные пучки ГМ чрезвычайно обильно снабжены СФ-положительными терминалами (СФПТ) (рис. 1). Они представляют собой сеть варикозных аксонов, которая избирательно окружает пучки ГМ и заканчивается непосредственно на их поверхности. Синаптические структуры, соответствующие варикозностям, благодаря их интенсивному окрашиванию реактивом в черный цвет, хорошо видны не только на продольных, но и на поперечных срезах вокруг различного диаметра бронхов (см. рис. 1, 2). Некоторые СФПТ из мышечной пластинки выходят в собственную пластинку слизистой оболочки и прослеживаются

ся, находясь в тесной связи с мелкими кровеносными сосудами, а часть из них близко подходит к базальной мембране эпителия. Терминальные веточки этого сплетения наблюдаются и в дистальных отделах бронхиального дерева, причем практически везде они непосредственно связаны с ГМ.

В автономных нервных сплетениях, расположенных среди лимфоидной ткани бронхов, часто встречаются микроангии (рис. 3) и одиночные парасимпатические нейроны. Последние хорошо идентифицируются использованными иммуногистохимическими методами, благодаря наличию вокруг их тел перичеселлюлярных синаптических аппаратов, образованных преангионарными нервными волокнами; синаптические бутоны имеют интенсивный черный цвет, а перикарионы остаются слабо окрашенными.

Не менее интересные результаты были получены в отношении иннервации ЛВ (рис. 4). Установлено, что в отличие от стенок бронхов и артерий, содержащих гладкую мышечную ткань, средняя оболочка ЛВ содержит сердечную поперечнополосатую мышечную ткань, ее кардиомиоциты (КМЦ) гомологичны КМЦ предсердия. Анализ иммуногистохимической реакции на СФ показал, что КМЦ средней оболочки стенки ЛВ, так же как и мышечная пластинка слизистой оболочки бронхов, хорошо иннервированы.

Неожиданным оказалось почти полное отсутствие нервных аппаратов в стенке ветвей легочной артерии. Ни в адвентиции, ни в средней оболочке, представленной ГМ и эластическими мембранами, ни в интима не удалось обнаружить СФПТ. Исключение, пожалуй, составляют лишь часть мелких артерий и артериол, располагающихся преимущественно в адвентиции бронхов (см. рис. 1, 2). В нескольких случаях удалось наблюдать, что именно на них присутствует густая сеть СФПТ, источником которой является основное терминальное сплетение пучков, окружающих ГМ мышечной пластинки слизистой оболочки бронха.

**Обсуждение полученных данных.** Ранее иннервация воздухоносных путей легкого изучалась на различных стадиях онтогенеза. М.Р. Spagow и соавт. [8] исследовали иннервацию и функции респираторного отдела легкого у эмбрионов свиньи. Интенсивное нервное снабжение бронхиального дерева было выявлено иммуногистохимическим методом при реакции на нейрофиламенты, показавшей, что волокна иннервируют воздухоносные пути, вплоть до терминального отдела. Было обнаружено, что электрическая стимуляция вызывала быстрое сужение

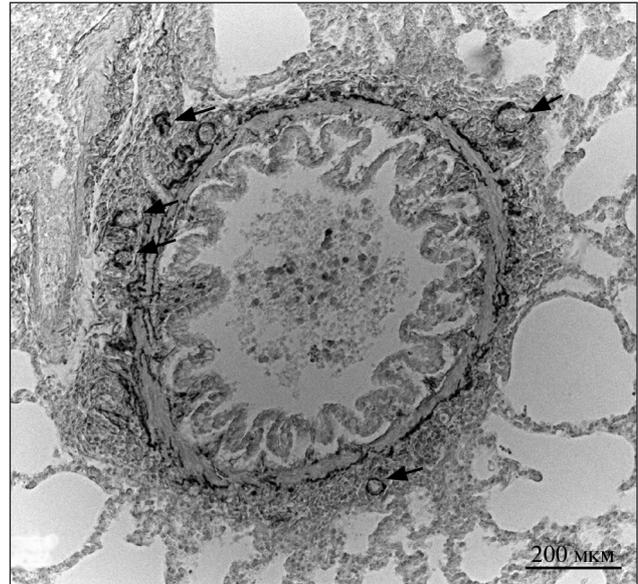


Рис. 2. Сплетение, образованное синаптофизин-положительными терминалями в мышечной пластинке слизистой оболочки малого бронха и вокруг мелких бронхиальных артерий (артериол), в легком крысы (стрелки).

Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин без докраски.



Рис. 3. Микроангий внутри пучка нервных волокон, расположенных в слизистой оболочке бронха, инфильтрированной лимфоцитами в легком крысы.

Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин без подкраски.

бронхов, которое блокировалось атропином и тетродотоксином [8]. Этот факт указывает на холинергическую иннервацию бронхов.

Иннервацию бронхов у людей также изучали на срезах, окрашенных при помощи маркированных антител к пептидному генному продукту 9.5 (PGP 9.5), пептиду, связанному с кальцитонинным геном (CGRP), гастрин-релизинг пептиду (GRP) [10]. В другой работе [5] пептидергические нервы, снабжающие внутрилегочные сосуды,

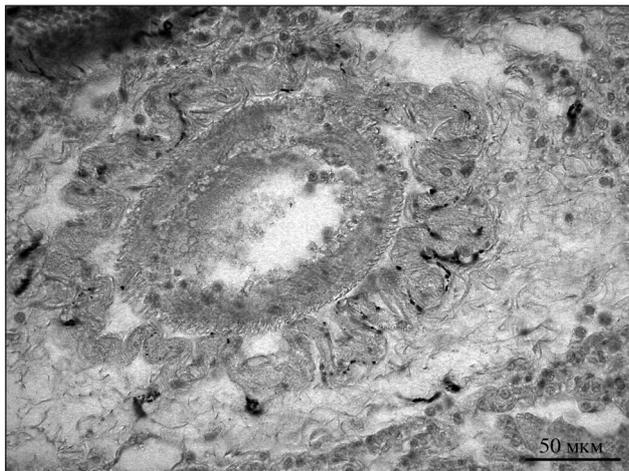


Рис. 4. Интрапульмональный отдел легочной вены (ЛВ) крысы.

Наружная часть средней оболочки образована кардиомиоцитами, среди которых видны синаптофизин-иммунопозитивные терминалы окрашенные в черный цвет. Иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин без подкраски.

были изучены у детей (1 мес и старше), молодых людей, а также у детей с легочной гипертензией. С помощью иммуногистохимической техники определяли распределение и относительную плотность нервных волокон, содержащих различные регуляторные пептиды: PGP 9.5, соматостатин, тирозингидроксилазу (ТН), нейропептид тирозин, вазоактивный интестинальный пептид, субстанцию Р. Было отмечено, что наиболее выражена по сравнению с другими пептидами реакция на PGP 9.5, который обнаруживался во всех нервных стволах и пучках в адвентиции и средней оболочке внутрилегочных сосудов. По мнению авторов, во всех возрастных группах у здоровых и больных детей в легких преобладают ТН-иммуноположительные аксоны, связанные с легочными кровеносными сосудами. В большем количестве такие аксоны присутствуют в стенке вены, чем артерии, где они представлены отдельными волоконцами. Отмечено, что в норме и при гипертензии в легких относительная плотность расположения нервных волокон увеличивалась с возрастом в артериях респираторного отдела. Судя по иллюстрациям, эти сосуды представляют собой мелкие артерии и артериолы с утолщенной стенкой и узким просветом [5].

В нашем исследовании, в отличие от работ, упомянутых выше, удалось обнаружить наличие богатой иннервации сосудистого русла и бронхиального дерева легкого крысы. В паренхиме легкого нами выявлены три нервных сплетения и определена их локализация вокруг венозных и артериальных сосудов и бронхиального дерева. Терминальное синаптическое сплетение

было выявлено только в средней оболочке ЛВ и мышечной пластинке слизистой оболочки бронхов. Его концевые структуры (СФПТ), имеющие вид варикозностей, представляют собой синапсы типа *en passant* [3]. В таких варикозностях, по данным электронно-микроскопических и иммуногистохимических исследований, находятся не только нейромедиаторы, но и регуляторные пептиды. Основываясь на собственном материале и данных литературы, можно предположить, что они являются эфферентными нервными окончаниями парасимпатического происхождения. Подтверждением этого служат факты обнаружения СФПТ на телах парасимпатических нейронов и на КМЦ сердца и ЛВ [3, 4].

По нашим данным, наибольшая плотность расположения СФПТ характерна для мышечной пластинки слизистой оболочки бронхов. Нервные терминалы прослеживаются вдоль основного ствола бронха, начиная от области ворот, вплоть до самых тонких бронхиол (25–50 мкм).

Второе место по интенсивности иннервации занимает стенка ЛВ, средняя оболочка которой представлена КМЦ [3]. Наибольшая плотность расположения СФПТ в ней отмечена в области ворот легкого, а по мере уменьшения диаметра сосудов при их разветвлении уменьшается и плотность расположения синаптических окончаний. Имеются данные, что КМЦ средней оболочки ЛВ контактируют с холинергическими и адренергическими нервами и отвечают на электрические и фармакологические воздействия таким же образом, как и мышечная ткань предсердий [2, 5, 6]. В отличие от ЛВ в стенке ветвей легочной артерии СФПТ не найдены.

Таким образом, принимая во внимание выявленные различия в иннервации бронхиального дерева и кровеносных сосудов, а также отсутствие эфферентной иннервации в стенке легочной артерии, можно заключить, что у крысы преобладают парасимпатические нервные волокна, которые участвуют в регуляции функций воздухоносных путей. Однако источники происхождения этих волокон нуждаются в уточнении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
2. Туров А. Н., Покушалов Е. А. и Шугаев П. Л. Особенности входящей активации устьев легочных вен. Вестн. аритмол., 2006, вып. 45, с. 68–74.
3. Чумасов Е. И., Ворончихин П. А., и Коржевский Д. Э. Иннервация сердечной поперечнополосатой мышечной ткани

- легочных вен крысы. Морфология, 2011, т. 140, вып. 6, с. 53–55.
4. Чумасов Е. И., Петрова Е. С. и Коржевский Д. Э. Иннервация сердца крысы (иммуногистохимическое исследование). Морфология, 2009, т. 135, вып. 2, с. 33–37.
  5. Allen K. M., Wharton J., Polak J. M. and Haworth S. G. A study of nerves containing peptides in the pulmonary vasculature of healthy infants and children and of those with pulmonary hypertension. *Br. Heart J.*, 1989, v. 62, № 5, p. 353–360.
  6. De Almieda O. P., Bohm G. M., Calvalho M. P. and de Calvalho A. P. The cardiac muscle in the pulmonary vein of the rat: a morphological and electrophysiological study. *J. Morphol.*, 1975, v. 145, p. 409–434.
  7. Haley K. J., Drazen J. M., Osathanondh R. and Sunday M. E. Comparison of the ontogeny of protein gene product 9.5, chromogranin A and proliferating cell nuclear antigen in developing human lung. *Microsc. Res. Tech.*, 1997, v. 37, p. 62–68.
  8. Sparrow M. P., Warwick S. P. and Everett A. W. Innervation and function of the distal airways in the developing bronchial tree of fetal pig lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1995, v. 13, № 5, p. 518–525.
  9. Sparrow M. P., Weichselbaum M. and McCray P. B. Development of the innervations and airway smooth muscle in human fetal lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1999, v. 21, № 55, p. 607–620.
  10. Springall D. R., Cadiex A., Oliveira H. et al. Retrograde tracing shows that CGRP –immunoreactive nerves of rat trachea and lung

originate from vagal and dorsal root ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1987, v. 20, № 2, p. 155–166.

Поступила в редакцию 18.02.2012

#### **EFFERENT INNERVATION OF PULMONARY BLOOD VESSELS AND BRONCHI IN RAT (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)**

*Ye. I. Chumasov, P. A. Voronchikhin and D. E. Korzhevskiy*

In this investigation the peculiarities of innervation of bronchi and blood vessels of the lung were studied in 20 rats using immunohistochemical demonstration of synaptophysin and  $\alpha$ -actin. The results obtained have shown that the densest innervation is typical for bronchial walls, particularly, for the muscular lamina. Synaptophysin-immunoreactive terminals (SFIT) were detected in the bronchi in close association with both circular bundles of smooth muscle cells and microganglia. Dense network of SFIT was found in the pulmonary vein — in its middle tunic formed by cardiomyocytes. In contrast to the bronchi and pulmonary vein, large branches of the pulmonary artery contained no SFIT. We briefly discuss the problem of the origin of the nerve fibers described and their functions and suggest that SFIT are formed by efferent fibers (axons) of neurons arising from either the intrapulmonary parasympathetic ganglia.

**Key words:** *lung, bronchi, blood vessels, innervation, synaptophysin*

RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine