

© О. А. Фоканова, Т. А. Румянцева, 2014
УДК 611.89.018:612.65:599.323.4

О. А. Фоканова и Т. А. Румянцева

ВОЗРАСТНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ КЛЕТЧНОГО СОСТАВА БОЛЬШОГО ТАЗОВОГО ГАНГЛИЯ У КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ДЕСИМПАТИЗАЦИИ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), Ярославская государственная медицинская академия

На 140 самках крыс линии Вистар изучены нейроны большого тазового ганглия (БТГ) интактных крыс различного возраста (от новорожденных до 180 сут). Экспериментальным животным для десимпатизации с 3-х по 29-е сутки жизни ежедневно внутривентриально вводили 0,3 мл гуанетидина (60–70 мг/кг). Для установления особенностей развития БТГ оценивали площадь сечения тел нейронов и характер гистограмм их клеточного состава. Выявлены периоды интенсивного роста величины нейронов: с 5-х до 10-х, с 14-х до 30-х и с 60-х до 90-х суток. Эти периоды сменялись относительной стабилизацией параметра, что придавало этому процессу ступенчатый характер. Окончательная стабилизация популяции нейронов БТГ наступала на 90-е сутки. Десимпатизация вызывала гибель части популяции нейронов и нарушение нормальной возрастной динамики их роста. В БТГ отмечалась фазная реакция на введение нейротоксина. С 14-х до 21-х суток средняя площадь сечения клеток была ниже нормы, с 21-х до 60-х суток — превышала контрольные значения. С 90-х до 180-х суток наблюдалось уменьшение площади сечения нейронов, и она становилась ниже, чем в контроле — вторичный нейродистрофический процесс. Отсутствие крупных нейронов 5–7-го классов при десимпатизации отражает не только задержку их роста, но и неспособность сохранившихся нейронов к гипертрофическим компенсаторным реакциям в результате нарушения трофических влияний.

Ключевые слова: тазовые ганглии, нейроны, гуанетидин, десимпатизация, гистограммы

Состояние и уровень развития нейрогуморальной регуляции, ее отдельных звеньев во многом определяют возможности адаптации организма к среде обитания [5, 7], характер изменений в обмене, функции и структуре тканей и органов целостного организма [8, 10–12]. Показаны различия влияний чувствительных и симпатических центров на ткани-мишени, выделена специфика развития в них дистрофических и компенсаторных изменений при разных видах денервации [2]. В то же время, недостаточно изучены изменения нейронов и компенсаторные процессы в ганглиях при нарушении межнейрональных связей.

Ганглии тазового сплетения занимают особое место в автономной нервной системе, отличаясь полиморфизмом клеточного состава, локализацией в них симпатических, парасимпатических и чувствительных нейронов с широким спектром нейротрансмиттеров. Однако до настоящего времени недостаточно данных о преобразованиях нейронов большого тазового ганглия (БТГ) в постнатальном онтогенезе белых крыс.

Цель данного исследования — изучение возрастных изменений морфометрических характеристик нейронов БТГ и выявление особенностей

их развития в условиях химической десимпатизации.

Материал и методы. Работа выполнена на 140 самках белых крыс линии Вистар, которые на основании изменения характера питания, массы и функциональной зрелости их систем в соответствии с периодизацией онтогенеза крыс, предложенной И. П. Западнюком и соавт. [4], были разделены на возрастные группы. Изучены нейроны БТГ 84 интактных белых крыс следующих возрастных групп: новорожденные — 3-, 5-е сутки, подсосного периода — 7-, 10-, 14-, 21-е сутки, инфантильного периода — 30-е сутки, начала ювенильного периода — 60-е сутки, середины ювенильного периода — 90-е сутки, конца ювенильного периода — 120-е сутки, начала и середины молодого возраста — 150-е и 180-е сутки (по 7 животных в группе).

Экспериментальная группа состояла из 56 самок крыс в возрасте 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 и 180 сут. Для достижения десимпатизации животным с 3-х по 29-е сутки жизни ежедневно внутривентриально вводили 0,3 мл водной взвеси гуанетидина из расчета 60–70 мг/кг. Исследование выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Эффективность десимпатизации контролировали по количеству нейронов в шейно-грудных ганглиях, подсчитываемому на серийных парафиновых срезах: на момент окончания инъекций достигалась гибель 92%, на 60-е сутки — 95–97% нейронов.

Для исследования брали правые БТГ. Материал фиксировали в 4% нейтральном формалине, обезжизняли и зали-

Сведения об авторах:

Фоканова Ольга Анатольевна (e-mail: oafokanova-76@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии;

Румянцева Татьяна Анатольевна (e-mail: rum-yar@mail.ru), кафедра анатомии человека, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

вали в парафин. Нейроны БТГ изучали на срезах толщиной 5–7 мкм, окрашенных тионином по Нисслю.

БТГ отличается многообразием вариантов строения, у самок крыс чаще всего имея вид группы отдельных узелков, вплотную прилежащих к адвентиции прямой кишки. Это делает невозможным подсчет общего количества нейронов в ганглии. Поэтому под микроскопом Биолам ац-12 (ЛОМО, Россия) на площади 5061 мкм² среза ганглия, ограниченной окулярной сеткой (бинокулярная насадка 1,5, об.40, ок. 10) [1], подсчитывали количество нейронов в 10 случайно выбранных полях для каждого ганглия. С помощью цифровой камеры MYSCOPE 500M (Webbers, Китай) получали микрофото БТГ, на которых с помощью программы ImageJ измеряли площадь сечения 100 клеток для каждого ганглия. Для характеристики клеточного состава ганглиев использовали метод гистограмм. Количество классов в гистограммах определяли согласно формуле Стерджеса: 7 размерных классов с границами до 40, 41–108, 109–176, 177–244, 245–312, 313–380, 381 мкм² и более [6]. Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики, использовали MS Excel. Оценку значимости различий проводили по t-критерию Стьюдента.

Используя морфологические критерии, предложенные Н.Е.Ярыгиным [9], у экспериментальных животных оценивали выраженность дистрофических изменений нейронов (определяли долю нейронов с дистрофическими изменениями — дистрофический индекс).

Результаты исследования. При окрашке тионином в БТГ выявлялись нейроны, расположенные крупными группами, разделенными пучками нервных волокон. Тела нейронов имели преимущественно эллипсоидную форму и ровные контуры. Ядро располагалось либо в центре клетки, либо было смещено на периферию. В период наблюдений с 3-х до 14-х суток ядра нейронов БТГ были особенно крупными, а цитоплазма окружала их тонким ободком.

Плотность расположения нейронов БТГ в зависимости от возраста составляла от 26±4 (3–5 сут) до 13,1±2,4 (180 сут) клеток на стандартной площади среза. В целом за период наблюдения плотность расположения нейронов в БТГ снижалась в 1,9 раза (P<0,01).

Площадь поперечного сечения нейронов (рис. 1) увеличивалась за период наблюдения с 36,3±0,4 мкм² в ганглии у новорожденных до 211±4 мкм² в ганглии у 180-суточных крыс, т. е. в 5,8 раза (P<0,05).

В период наблюдения с 5-х до 10-х суток после рождения происходило значимое увеличение площади сечения нейронов с 36,3±0,4 до 92,4±2,7 мкм² (P<0,05), в 2,5 раза. В период с 14-х по 30-е сутки этот показатель увеличился до 149,1±1,3 мкм² (P<0,05), т. е. в 1,3 раза. Далее с 30-х до 60-х суток ювенильного возраста площадь сечения тел нейронов не изменялась. С 60-х до 90-х суток она вновь возрастала с 148,3±1,3 до 203,0±2,4 мкм², т. е. в 1,4 раза. Начиная с 90-х

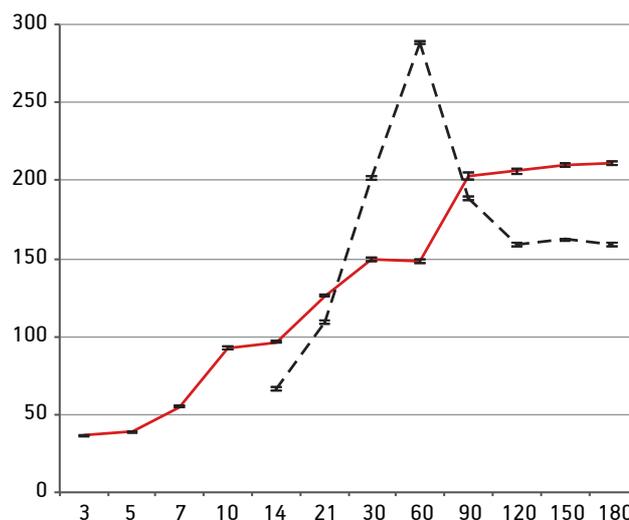


Рис. 1. Площадь сечения нейронов большого тазового ганглия у интактных (I) крыс разного возраста и при десимпатизации введением гуанетидина (II).

По оси абсцисс — возраст крыс (сут); по оси ординат — площадь сечения тел нейронов (мкм²)

суток, средняя площадь сечения тел нейронов стабилизировалась.

У новорожденных крысят (3–7-е сутки) в БТГ (рис. 2) присутствовали нейроны первых двух классов. Начиная с 10-х суток обнаруживались нейроны 3-го класса (58%). Клетки 1-го класса в этом возрасте отсутствовали.

В период с 14-х до 21-х суток появлялись нейроны 2–5-го классов, причем пик величины показателя на гистограмме приходился на нейроны 3-го класса, и возрастала доля клеток 4-го класса. На 30-е сутки жизни животного обнаруживались нейроны уже 6 классов, доля клеток 2-го класса значимо снижалась. Появлялось значимое количество нейронов 5-го класса (3%). В период с 60-х до 90-х суток отмечено наличие нейронов 2–7-го классов. Уменьшалась доля клеток 2-го класса, при возрастании доли 4–7-го классов. С 90-х по 180-е сутки значимых изменений гистограммы отмечено не было. Таким образом, дефинитивный набор нейронов (7 размерных классов) БТГ приобретал на 60-е сутки жизни животного.

При введении гуанетидина часть нейронов в БТГ имели отчетливо выраженные признаки дистрофии: вакуолизацию цитоплазмы, смещение ядра на периферию клетки, равномерное распыление хроматофильного вещества и диффузное слабое окрашивание цитоплазмы тионином. Часть клеток находились в фазе сморщивания и некроза, встречались безъядерные клетки. Доля гибнущих нейронов на 14-е и 21-е сутки на фоне введения нейротоксина составляла 8 и 9% соответственно. Наибольшую выраженность эти изменения имели

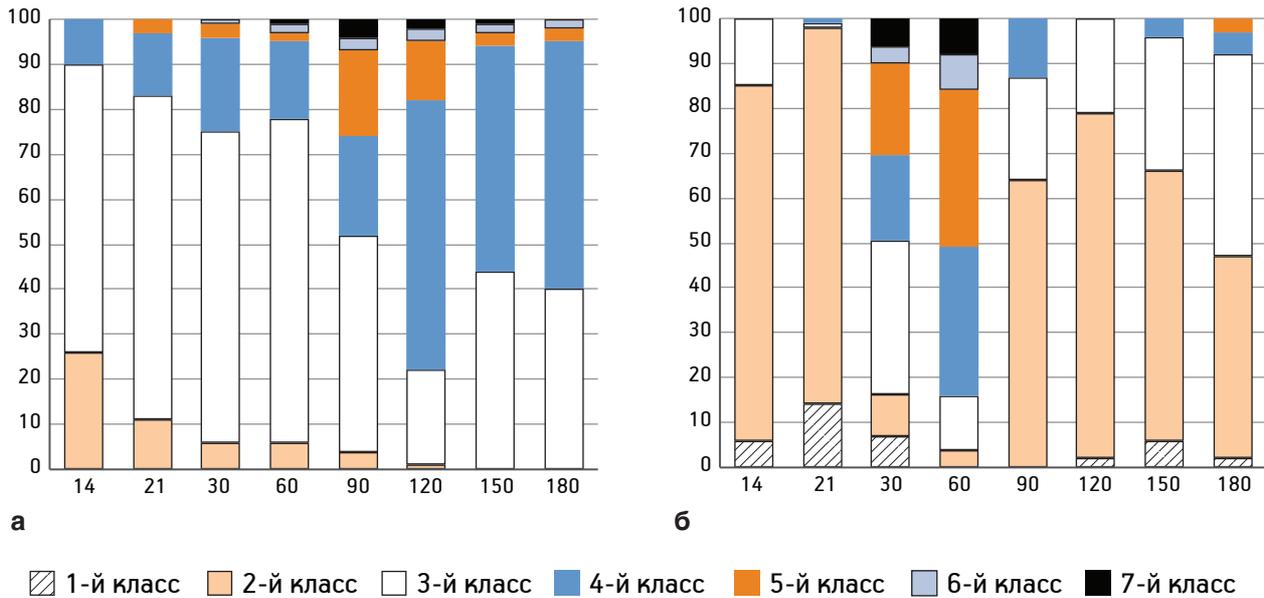


Рис. 2. Гистограммы распределения нейронов в большом тазовом ганглии по площади сечения их тел у интактных (а) крыс разного возраста и после десимпатизации гуанетидином (б).

По оси абсцисс — возраст крыс (сут); по оси ординат — доля нейронов каждого размерного класса (%)

в период с 30-х до 90-х суток, когда дистрофический индекс достигал 14% по сравнению с 1% в норме. Однако и в отдаленные сроки в популяции отмечалось 9–11% нейронов с признаками дистрофий. Такая динамика дистрофического индекса свидетельствует о наличии нейронов, которые гибнут уже во время введения нейротоксина, и о развитии в ганглии персистирующего дистрофического процесса, как реакции на системную гибель симпатоцитов.

Плотность расположения нейронов в БТГ, окрашенного тионином, изменялась в течение наблюдения в 3 раза, от 22 ± 6 до $7,8 \pm 1,4$ на стандартной площади среза ганглия. При этом, в период с 14-х до 30-х суток этот показатель значительно снижался в 1,2 раза. С 30-х до 60-х суток плотность расположения нейронов продолжала снижаться до 13 ± 4 клеток, затем до 90-х суток значительно не изменялась. На 120-е сутки происходило уменьшение количества нейронов на стандартной площади среза до $10,0 \pm 2,7$ ($P < 0,05$), в конце наблюдения на 150-е и 180-е сутки — ещё на 47 и 44% соответственно. Таким образом, на фоне введения гуанетидина отмечено отклонение показателя плотности расположения нейронов от такового в контроле, это косвенно указывает на гибель значительной части популяции.

Десимпатизация вызывает не только гибель части популяции нейронов, но и нарушение нормальной возрастной динамики роста сохранившихся клеток. Средняя площадь сечения тел нейронов у десимпатизированных животных на 14-е сутки составляла $66,30 \pm 0,04$ мкм², в период с

14-х до 60-х суток она прогрессивно нарастала до 289 ± 9 мкм² ($P < 0,05$). Затем с 60-х до 120-х суток происходило снижение средней площади сечения нейронов до $158,6 \pm 2,2$ мкм² ($P < 0,05$). У крыс при десимпатизации в период с 120-х до 180-х суток площадь сечения нейронов значительно не изменялась (см. рис. 1).

При сравнении средней площади сечения нейронов БТГ оказалось, что с 14-х до 21-х суток у экспериментальных животных она была ниже нормы ($P < 0,05$), но уже на 30-е сутки этот показатель у подопытных крыс превосходил таковой в норме в 1,35 раза ($P < 0,05$). К 60-м суткам различия нарастали до двух раз ($P < 0,05$). В последующие сроки у подопытных крыс площадь сечения нейронов снижалась, а у интактных — увеличивалась, что привело к смене соотношения показателей, и, начиная с 90-х суток, наблюдалось отставание показателя площади сечения нейронов БТГ у десимпатизированных крыс от его возрастной нормы ($P < 0,05$).

Распределение нейронов в БТГ по размерным классам при химической десимпатизации у 14- и 21-суточных крыс отличалось от такового в контроле расположением на гистограмме пика величины показателя во 2-м классе вместо 3-го и уменьшением доли нейронов 3–5-го классов. У 30-суточных крыс присутствовали нейроны 1-го класса (7%, в норме — 0%), высокая доля клеток 5-, 6-, 7-го классов (30%, в контроле — 3%). Характер различий гистограмм у 60-суточных интактных и экспериментальных животных сходен с таковым у 30-суточных.

Начиная с 90-х суток, распределение нейронов различных размерных классов в БТГ при десимпатизации отличалось от такового в контроле, наоборот, отсутствием 5–7-го классов и высокой долей нейронов 2-го класса, которых в норме нет.

Подводя итог, можно отметить, что введение гуанетидина вызывает в ранние сроки гибель более крупных нейронов или задержку их роста, затем в популяции наблюдается резкое увеличение доли нейронов средних размеров, а с 60-х суток популяция отличается низким показателем средней площади сечения тел нейронов при сохранении высокого уровня дистрофических изменений.

Обсуждение полученных данных. Наиболее интенсивный рост нейронов в БТГ происходит с 5-х до 10-х суток (максимальная скорость прироста), с 14-х до 30-х суток и с 60-х до 90-х суток. Эти периоды сменяются периодами относительной стабилизации размера нейронов, что придает процессу их увеличения ступенчатый характер. Стабилизация популяции нейронов БТГ наступает на 90-е сутки. Сравнение с данными аналогичных исследований, проведенных на этих же животных [8], показало, что существует гетерохрония достижения популяциями нейронов дефинитивного состояния по показателю площади сечения клеток. Так, нейроны интрамуральных ганглиев желудка достигают дефинитивного размера уже на 30-е сутки, нейроны шейно-грудных ганглиев — на 90-е сутки, т. е. популяция нейронов тазовых ганглиев по динамике размерных показателей близка к нейронам симпатических ганглиев. Это косвенно указывает на отставание созревания симпатического отдела автономной системы в целом от остальных её частей, что подтверждает роль этого отдела как системы адаптации к внешним воздействиям, наиболее надежно функционирующей в дефинитивном состоянии.

В БТГ отмечается фазная реакция на введение нейротоксина: с 14-х до 21-х суток средняя площадь сечения клеток ниже нормы — гибель части популяции и задержка роста остальных нейронов, с 21-х до 60-х суток — резкое увеличение площади сечения нейронов по сравнению со значениями в контроле. С 90-х до 180-х суток — уменьшение площади сечения нейронов, и она становится ниже, чем в контроле — вторичный нейродистрофический процесс. Таким образом, гуанетидин к окончанию инъекций вызывает срыв компенсаторных возможностей, который переводит систему на другой уровень функционирования, отличающийся от такового у контрольных животных низкой гетерогенностью клеточного состава ганглия. Отсутствие крупных нейронов 5–7-го клас-

сов отражает не только задержку роста нейронов, но и неспособность сохранившихся нейронов к гипертрофическим компенсаторным реакциям в результате нарушения трофических влияний.

Химическая десимпатизация с рождения нарушает возрастную динамику роста нейронов БТГ, но выраженность этих нарушений в последнем несопоставимо меньше, чем в симпатических шейно-грудных ганглиях, в которых гибнут 95–97% нейронов, и превосходит таковую в интрамуральных ганглиях желудка, где дистрофический индекс ниже, и отставание нейронов в размерах компенсируется на 90-е сутки, а на 180-е сутки средняя площадь их сечения уже значимо превышает таковую в контроле [3, 8]. Судя по изученным показателям, органоспецифичность реакции свидетельствует о значительном количестве нейронов, чувствительных к симпатолитику, и неспособности сохранившихся нейронов компенсировать последствия химической десимпатизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Практическая морфометрия органов и тканей: для врачей-патологоанатомов. Томск, изд. Томск. гос. ун-та, 1998.
2. Волкова О.В. Нейродистрофический процесс. М., Медицина, 1978.
3. Воробьева О.Б. и Ботяжова О.А. Активность ферментных систем интрамуральных ганглиев и чувствительность двенадцатиперстной кишки к веществам медиаторной природы в постнатальном онтогенезе крысы. В кн.: Материалы междунар. конф., посвящ. 150-летию И.П. Павлова, СПб., изд. Ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1999, с. 62–63.
4. Западнюк И.П., Западнюк В.И. и Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев, Вища школа, 1974.
5. Коротовская О.А. Морфология каудального брыжеечного ганглия и ганглиев тазового сплетения у представителей семейств собачьих и куньих: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Омск, 2010.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., Высшая школа, 1990.
7. Леонтьев А.С. Структурное разнообразие как критерий системной характеристики процессов морфогенеза. Морфология, 1996, т. 104, вып. 2, с. 64–67.
8. Румянцева Т.А. Влияние химической десимпатизации и деафферентации на нейроны экстра- и интрамуральных ганглиев в постнатальном онтогенезе белой крысы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Ярославль, 2002.
9. Ярыгин Н.Е. и Ярыгин В.Н. Патологические и приспособительные изменения нейрона. М., Медицина, 1973.
10. Akeov G.N. and Chalisova N.I. Role of neurotrophic factors in adaptational processes of the nervous system. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 1997, v. 27, № 3, p. 207–211.
11. Andrews T.J., Thrasivoulou C., Nesbit W. and Cowen T. Target-specific differences in the dendritic morphology and neuropeptide content of neurons in the rat SCG during development and aging. *J. Comp. Neurol.*, 1996, v. 368, № 1, p. 33–44.

12. Bellinger D. L., Lorton D., Hamill R. W. et al. Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervations. *Brain Behav. Immun.*, 1993, v. 7, № 3, p. 191–204.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

AGE CHANGES OF CELLULAR COMPOSITION OF RAT MAJOR PELVIC GANGLION IN NORM AND AFTER DESYMPATHIZATION

O. A. Fokanova and T. A. Romyantseva

The neurons of major pelvic ganglion (MPG) were studied in 140 female Wistar rats of different ages (from newborns up to 180 days). For desympathization, experimental animals were daily intraperitoneally injected with 0.3 ml guanethidine (60–70 mg/kg) from Day 3 to Day 29. To detect the peculiarities of development, the cross-sectional area of neuronal cell bodies and the characteristics of the histograms of their cellular composition were evaluated. The periods of intensive growth in the size of neurons were detected: from Day 5 till Day 10, from Day 14

till Day 30 and from Day 60 till Day 90. These periods were followed by a relative stabilization of the parameter, indicating the stepwise nature of the process. Final stabilization of MPG neuronal populations occurred at Day 90. Desympathization caused the death of a part of a population of neurons, and disruption of normal age-related dynamics of their growth. Phase response to the injection of the neurotoxin was found in MPG. From Day 14 till Day 21, an average cross-sectional area of the cells was below normal, while from Day 21 till Day 60 it exceeded the control values. From Day 90 till Day 180, the cross-sectional area of neurons decreased, becoming lower than in control, indicating a secondary neurodystrophic process. The absence of class 5–7 large neurons after desympathization reflects not only the delay of their growth, but also the inability of surviving neurons to compensatory hypertrophic reactions as a result of disruption of trophic influences.

Key words: *pelvic ganglia, neurons, guanethidine, desympathization, histograms*

Department of Histology, Cytology and Embryology; Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical Academy

© Коллектив авторов, 2014
УДК 612.178:612.65

П. М. Маслюков¹, А. И. Емануйлов², А. В. Булибин¹, А. А. Зверев³ и Т. А. Аникина³

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОПЕПТИД Y-ЕРГИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИИ СЕРДЦА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

¹ Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), Ярославская государственная медицинская академия; ³ кафедра анатомии, физиологии и охраны здоровья человека (зав. — проф. Т. Л. Зефилов), Казанский федеральный университет

Нейропептид Y (НПУ)-содержащие волокна и нейроны интрамуральных узлов, а также Y₁- и Y₂-рецепторы НПУ выявляли в миокарде у крыс в постнатальном онтогенезе иммуногистохимическими методами. Полученные данные свидетельствуют о возрастных изменениях НПУ-опосредованной сердечной иннервации. У новорожденных животных плотность расположения НПУ-позитивных волокон была наименьшей и возрастала с момента рождения в течение первых 20 сут жизни. Y₁- и Y₂-рецепторы обнаруживались в сердце у новорожденных и более взрослых животных. Y₁-рецепторы были обнаружены в сердце в коронарных артериях, артериолах, кардиомиоцитах с момента рождения. Плотность расположения Y₂-рецепторов НПУ в миокарде юных (до 2 мес жизни) и взрослых крыс (до 1 года) была очень мала, однако значительно возрастала у старых крыс. Все нейроны интрамуральных узлов на протяжении постнатального онтогенеза оставались Y₁-иммунопозитивными и Y₂-иммунонегативными.

Ключевые слова: *сердце, иннервация, интрамуральные узлы, нейропептид Y, рецепторы*

Нейропептид Y (НПУ) и его рецепторы участвуют в разнообразных функциях нервной системы, включая регуляцию насыщения, эмоционального состояния, сосудистого тонуса, секреции желез желудочно-кишечного тракта [1, 3]. НПУ

весьма распространен в автономной нервной системе и в большом количестве обнаруживается в волокнах, иннервирующих сердце, коронарные и мозговые артерии, аорту, сосуды кожи и скелетных мышц у крысы, кошки, морской

Сведения об авторах:

Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@yuma.ac.ru), *Булибин Андрей Владимирович*, кафедра нормальной физиологии; *Емануйлов Андрей Игоревич*, кафедра анатомии человека, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная 5;

Зверев Алексей Анатольевич (Aleksei5@rambler.ru), *Аникина Татьяна Андреевна* (Tania57vg1@rambler.ru), кафедра анатомии, физиологии и охраны здоровья человека, Казанский федеральный университет, г. Казань, ул. Кремлевская, 18