

16. Patelska-Banaszeska M. and Wozniak W. The development of the epidural space in human embryos. *Folia Morphol. (Warsz)*, 2004, v. 63, № 3, p. 273–279.
17. Ursu T.R., Porter R.W. and Navartnam V. Development of the lumbar and sacral vertebral canal in utero. *Spine*, 1996, v. 21, № 23, p. 2705–2708.

Поступила в редакцию 23.04.08
Получена после доработки 04.10.08

MORPHOGENESIS OF HUMAN EPIDURAL SPACE IN THE EMBRYONIC AND EARLY FETAL PERIODS

A.A. Rodionov and Asfandiyarov R.I.

Epidural space development was studied in 51 embryos and early fetuses aged 4–13 weeks sectioned serially, using histological and embryological methods of plastic and graphic reconstruction. Three stages were determined in the development of the epidural space: I – primary epidural space (embryos of 16–31 mm crown-rump length [CRL]); II – reduction of the pri-

mary epidural space (embryos of 35–55 mm CRL); III – secondary epidural space (embryos of 60–70 mm CRL and fetuses of 80–90 mm CRL). Morphogenesis of the primary epidural space is determined by the forming influence of the spinal cord and its dura mater and that of the secondary one – by the walls of the spinal canal. In the correlation chain: the spinal cord – spinal cord dura mater — spinal canal, the latter two elements being under the inducing influence of the first one, determine the morphogenesis of the epidural space through the system of morphogenetic correlations. These correlations are manifested in the form of time-conjugated connection between the formation of the parts of spinal cord dura mater and the spinal canal causing the staged formation of the epidural space in ventrodorsal and craniocaudal directions. The same morphogenetic correlations also determine the stages in the development of the epidural space.

Key words: *spinal cord, dura mater, epidural space, morphogenesis.*

Department of Human Anatomy, Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Department of Human Anatomy, Astrakhan State Medical Academy

© Коллектив авторов, 2008
УДК 611.899:612.65

П.М. Маслюков, М.Б. Корзина, А.И. Емануйлов и В.В. Шилкин

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЙ СОСТАВ НЕЙРОНОВ КРАНИАЛЬНОГО ШЕЙНОГО И ЧРЕВНОГО СИМПАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Кафедра нормальной физиологии с курсом биофизики (зав. — проф. В.Н. Воловенко), кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин) Ярославской государственной медицинской академии, e-mail: mpm@yuma.ac.ru

Нейромедиаторный состав нейронов краниального шейного узла (КШУ) и чревных узлов (ЧУ) крыс разного возраста (новорожденных, 10-, 12-, 30- и 60-дневных) исследовали иммуногистохимическими методами. Результаты показали, что большинство нейронов этих симпатических узлов содержат тирозингидроксилазу (ТГ). Большая часть ТГ-позитивных нейронов являлась также нейропептид Y (НПУ) -позитивной. Доля нейронов, содержащих НПУ, возрастала с момента рождения до конца 1-го месяца жизни во всех исследованных узлах. В ЧУ НПУ содержала значимо большая доля нейронов, чем в КШУ. Вещество Р, вазоинтестинальный пептид и холинацетилтрансфераза обнаружены в единичных нейронах в КШУ и ЧУ с момента рождения. С возрастом доля таких нейронов не менялась. Окончательное установление нейромедиаторного состава в исследованных симпатических узлах отмечено к концу 1-го месяца жизни.

Ключевые слова: *симпатическая нервная система, краниальный шейный узел, чревные узлы, иммуногистохимия, онтогенез.*

Литературные данные свидетельствуют о том, что многие нейроны содержат одновременно несколько нейромедиаторов, число которых в одной клетке может достигать шести [9]. В катехоламинсодержащих нейронах найдены соматостатин, нейропептид Y (НПУ), опиоидные пептиды, галанин. В нейронах, не содержащих катехоламинов, выявляются вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), пептид, связанный с кальцитониновым геном, НПУ и вещество Р. Большинство норадренергических нейронов содержат НПУ [6, 9, 12].

В постнатальном онтогенезе в нейронах симпатических узлов идет перестройка медиаторного состава, которая может происходить под влиянием различных трофических факторов [8, 10, 11]. Установлено, что катехоламины содержатся в первичных симпатических узлах в эмбриональном периоде [7, 8]. В узлах солнечного сплетения морских свинок и паравертебральных узлах крыс тирозингидроксилаза (ТГ) вместе с НПУ выявляются на ранних эмбриональных стадиях [4, 14], еще до момента контакта с органами-мишенями или преганглионарными нейронами.

Ранее в работах, выполненных на звездчатом узле грызунов, установлено, что наибольшее количество нейронов с момента рождения содержат фермент синтеза катехоламинов — ТГ. Большинство холинацетилтрансферазо (ХАТ)-позитивных нейронов у новорожденных и 10-дневных крысят также являлись ТГ-положительными, у 30- и 60-дневных лишь в отдельных клетках выявлялись оба названных выше фермента. С момента рождения и на протяжении всех исследуемых возрастных периодов увеличивалась доля клеток, содержащих ТГ и НПУ. Вместе с этим, уменьшалось относительное содержание соматостатин-позитивных нейронов. Доля ВИП-положительных клеток и нейронов, содержащих ХАТ, возрастала до 10-х суток жизни, а затем снижалась. Показано также, что созревание набора нейромедиаторов в звездчатом узле крыс и мышей завершается к концу 2-го месяца жизни [2, 3, 11]. В то же время, сравнительный анализ развития нейронов других симпатических узлов в онтогенезе не проводился.

Целью настоящего исследования явилось определение иммуногистохимических характеристик нейронов краниального шейного (КШУ) и чревного узлов (ЧУ) крысы в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Работа выполнена на новорожденных, 10-, 12-дневных, 1-месячных и 2-месячных крысках (по 5 особей каждого возраста). После введения летальной дозы пентобарбитала натрия (Nembutal®, 300 мг/кг, внутривенно) животных перфузировали транскардиально изотоническим раствором с гепарином, а затем фиксирующей смесью 4 % параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). После перфузии краниальные шейные и чревные узлы с каждой стороны извлекали и помещали в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 ч. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали с помощью криостата. С целью выявления нейронов, содержащих ТГ, ХАТ, ВИП, НПУ и вещество Р, применяли мечение антителами (таблица).

Использованные первичные антитела

Тип антител	Животное-донор	Разведение	Источник
Вещество Р	Кролик	1:1000	Chemicon (США)
ТГ	Кролик	1:500	Biotrend (Германия)
ВИП	Кролик	1:400	Affinity (Великобритания)
НПУ	Кролик	1:500	Chemicon (США)
ХАТ	Коза	1:200	Chemicon (США)

Примечание. ТГ — тирозингидроксилаза; ВИП — вазоактивный интестинальный пептид; НПУ — нейропептид Y; ХАТ — холинацетилтрансфераза.

Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добав-

лением 10% сыворотки, 1% тритона X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в ФСБ срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом — флюоресцеин-изотиоционатом (Jackson Immuno Research Lab., США) в течение 2 ч (разведение 1:1000), дающим зеленую флюоресценцию.

Для расчета относительного содержания иммунопозитивных нейронов, кроме меток к отдельным нейромедиаторам, производили мечение всей нейронной популяции при помощи другого флюорохрома. С этой целью использовали краситель Neuro Trace (Molecular Probes, США) с красной флюоресценцией. После промывки в ФСБ срезы инкубировали в этом растворе в течение 20 мин (разведение 1:200).

Дальнейший анализ препаратов проводили при помощи флюоресцентного микроскопа ЛОМО Микмед 2, вариант 12 (ЛОМО, Россия), снабженного соответствующим набором светофильтров и CCD-камеры. Анализ изображений осуществляли с использованием компьютерных программ. Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов брали три центральных среза в каждом узле с интервалом между ними приблизительно 0,05 мм. При подсчете учитывали только нейроны с четко идентифицированным ядром. Долю иммунореактивных нейронов рассчитывали как отношение нейронов, иммунореактивных к данному маркеру на срезе, к общему числу нейронов на срезе и умноженное на 100. Площадь сечения нейронов определяли с использованием некоммерческой программы Image J (НИН, США). Для определения этого параметра в случайном порядке выбирали нейроны, иммунопозитивные к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе по методике, описанной Г.Г. Автандиловым [1].

Статистическая обработка включала определение средней арифметической и ее стандартной ошибки. О значимости различий судили по t-критерию Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Установлено, что достоверных различий распределения и морфометрических характеристик нейронов, иммунореактивных к различным маркерам, с правой и левой стороны в КШУ и ЧУ нет. В пределах узлов нейроны различных популяций располагались диффузно. Наибольшее количество нейронов в КШУ и ЧУ во всех возрастных группах являлись норадренергическими и содержали фермент синтеза норадреналина ТГ. Относительное содержание таких нейронов в раннем постнатальном онтогенезе практически не менялось и составляло от 88 ± 5 до $94 \pm 4\%$.

Большая часть ТГ-позитивных нейронов в КШУ и ЧУ являлись также НПУ-позитивными (рис. 1). Доля нейронов в КШУ и ЧУ, содержащих ТГ и НПУ, возрастала с момента рождения до конца 2-го месяца жизни во всех исследованных узлах (рис. 2). В ЧУ значимо большая доля нейронов содержали НПУ, чем в КШУ. Лишь единичные клетки в КШУ и ЧУ были иммунопозитивны к НПУ и ТГ-негативны.

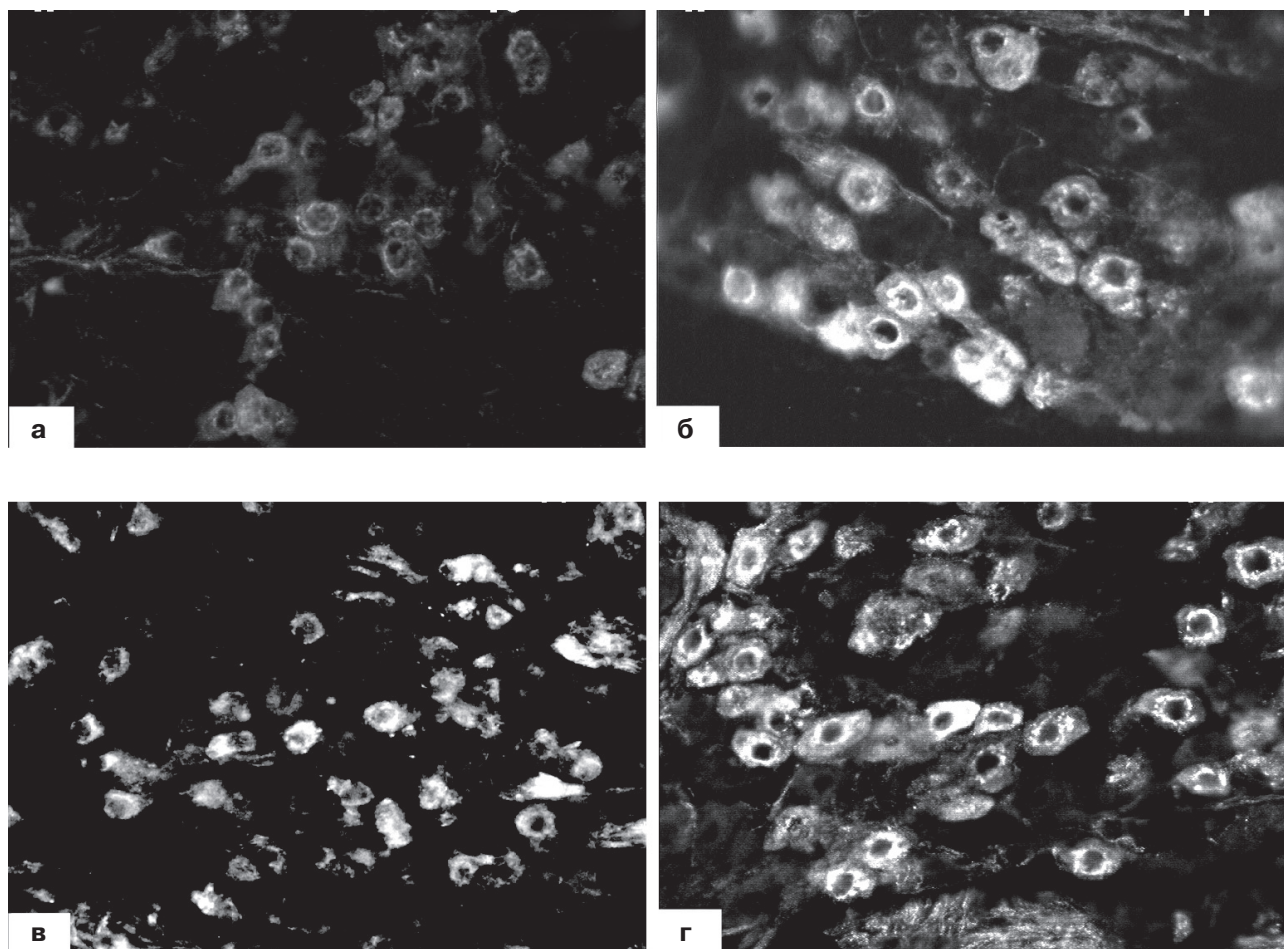


Рис. 1. Нейроны, содержащие нейропептид Y в чревном (а, б) и краниальном шейном (в, г) узлах у новорожденных (а, в) и 30-дневных крысят (б, г).

Флюоресценция флюоресцеин-изотиоцианата. Об. 10, ок. 10.

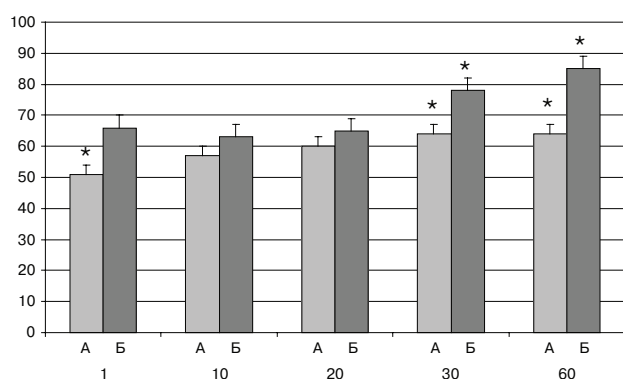


Рис. 2. Относительное содержание нейронов, экспрессирующих нейропептид Y в краниальном шейном и чревном узлах крысят разного возраста.

По горизонтальной оси — возраст крысят (сут); А — краниальный шейный узел; Б — чревный узел; по оси ординат — исследуемый параметр (%). Звездочки — различия значимые по сравнению с данными в соответствующих узлах у 10-дневных животных при $P < 0,05$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Вещество Р, ВИП и ХАТ обнаруживались в единичных нейронах в КШУ и ЧУ с момента рождения. С возрастом доля таких нейронов не менялась. Все ВИП-положительные клетки также содержали ХАТ.

При анализе морфометрических характеристик было выявлено, что нейроны, содержащие различные нейромедиаторы, имеют разную среднюю площадь сечения. Вещество Р-положительные нейроны в КШУ и ЧУ у всех крысят имели значимо наименьшие размеры ($P < 0,01$) (рис. 3). Нейроны, содержащие ВИП и ХАТ, имели значимо наибольшую среднюю площадь сечения в КШУ ($P < 0,05$). В ЧУ средняя площадь сечения ТГ-, ВИП- и ХАТ-позитивных нейронов значимо не различалась ($P > 0,05$). Во всех возрастных группах средняя площадь сечения нейронов, содержащих НПУ, в КШУ и ЧУ была значимо меньше, чем нейронов, содержащих ТГ ($P < 0,05$).

Средняя площадь сечения НПУ- и ТГ-позитивных нейронов в КШУ была значимо меньше, чем в ЧУ ($P < 0,01$).

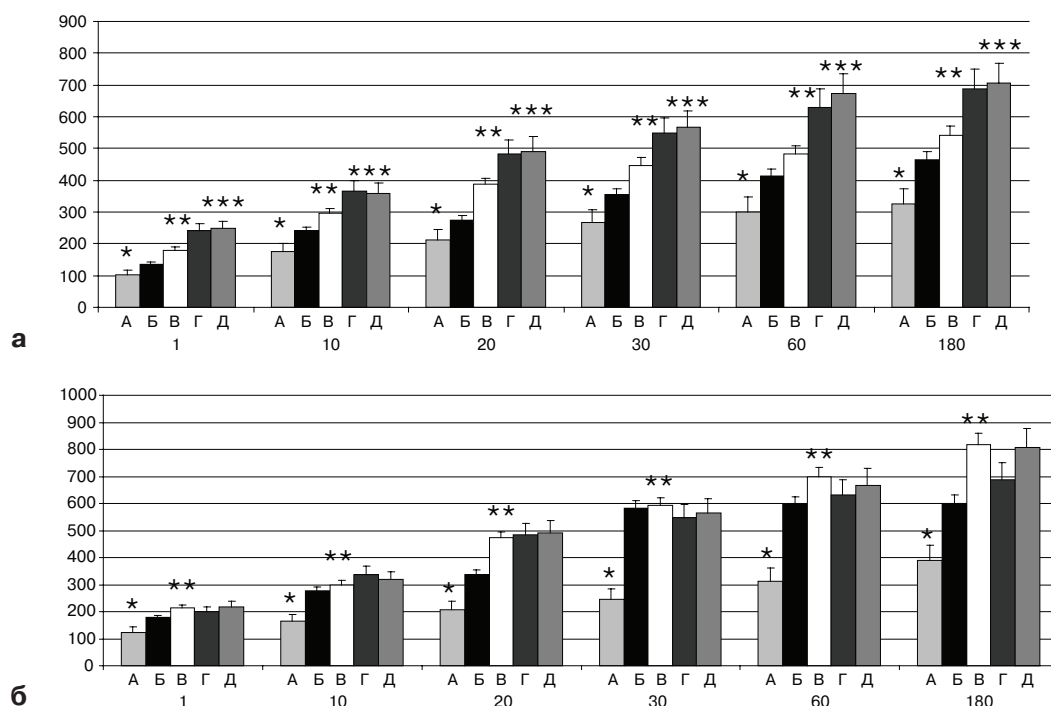


Рис. 3. Площадь сечения нейронов, иммунореактивных к веществу Р (ВР), нейропептиду Y (НПУ), тирозингидроксилазе (ТГ), вазоинтестинальному пептиду (ВИП), холинацетилтрансферазе (ХАТ) в краниальном шейном (а) и черевном (б) узлах крысят разного возраста.

По горизонтальной оси — А — ВР-позитивные нейроны; Б — НПУ-позитивные нейроны; В — ТГ-позитивные нейроны; Г — ВИП-позитивные нейроны; Д — ХАТ-позитивные нейроны; возраст крысят (сут); по оси ординат — исследованный параметр (мкм²); одна звездочка — различия значимы между группами ВР- и НПУ-позитивных нейронов; две звездочки — между группами ТГ- и НПУ-позитивных нейронов; три звездочки — между группами ТГ-позитивных и холинергических нейронов (ВИП- и ХАТ-позитивных) при $P < 0,05$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенной работы, наряду с ранее полученными данными при изучении звездчатого узла (ЗУ) [2, 3], свидетельствуют о том, что большинство нейронов изученных симпатических пара- и превертебральных узлов к моменту рождения являются катехоламинергическими и содержат ТГ. Большая часть ТГ-позитивных нейронов в узлах являются также НПУ-позитивными. В дальнейшем, в ходе возрастного развития, доля таких нейронов увеличивается. Возрастное увеличение доли катехоламинергических нейронов, содержащих НПУ, в постнатальном онтогенезе наблюдается у различных видов млекопитающих, в том числе и у человека [13].

Часть норадренергических нейронов содержат и другие нейромедиаторы. Небольшая доля симпатических холинергических нейронов содержат ВИП и ХАТ и иннервируют потовые железы и надкостницу [5]. В отличие от данных, полученных нами ранее при изучении ЗУ [2, 3], доля ВИП- и ХАТ-содержащих нейронов в КШУ и ЧУ была очень мала и с возрастом не менялась. Вероятно, отличия в динамике изменения процентного соотношения холинергических нейронов в КШУ, ЧУ

и ЗУ связаны с тем, что нейроны пара- и превертебральных симпатических узлов посылают свои волокна к различным органам-мишеням.

Тем не менее, холинергические нейроны присутствуют в различных симпатических узлах уже к моменту рождения. Это опровергает представление о том, что изначально холинергические нейроны являются катехоламинергическими, а переключение нейромедиаторного состава происходит в течение двух недель после рождения под влиянием трофических факторов, выделяемых органами-мишенями [5].

Нейроны симпатических узлов, содержащие различные нейромедиаторы, отличаются по средней площади сечения. В отличие от звездчатого узла [11], в КШУ и ЧУ НПУ-позитивные нейроны имеют меньшую среднюю площадь сечения, чем нейроны, содержащие ТГ. Популяция вещества Р-позитивных нейронов в КШУ и ЧУ представлена мелкими клетками.

Полученные данные дополняют сведения о постнатальном развитии нейронной организации автономной нервной системы, в частности о неоднородности клеточного состава нейронов звездчатого узла кошки и грызунов уже к моменту

рождения [2, 3]. Имеются отдельные популяции нейронов, различные по локализации, размерам, гистохимическим и функциональным характеристикам. Набор нейромедиаторов, характерный для взрослого организма, присутствует в нейронах симпатических узлов крысы уже с момента рождения, при этом развитие популяций нейронов, содержащих различные нейромедиаторы в КШУ, ЗУ и ЧУ, происходит гетерохронно. Окончательно состав нейромедиаторов в нейронах узлов стабилизируется к концу 1-го месяца жизни.

Работа поддержана РФФИ, грант 08-04-00470; грантом Президента РФ для поддержки молодых ученых-докторов наук (МД-175.2008.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д. и Тиммерманс Ж.-П. Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 2006, т. 92, № 2, с. 214–220.
3. Маслюков П.М., Шилкин В.В. и Тиммерманс Ж.-П. Иммуногистохимическая характеристика нейронов звездчатого узла симпатического ствола мыши в постнатальном онтогенезе. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 41–44.
4. Anderson R., Morris J. and Gibbins I.L. Neurochemical differentiation of functionally distinct populations of autonomic neurons. J. Comp. Neurol., 2001, v. 429, p. 419–435.
5. Asmus S.E., Parsons S. and Landis S.C. Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum. J. Neurosci., 2000, v. 20, p. 1495–1504.
6. Baffi J., Görcs T., Slowik F. et al. Neuropeptides in the human superior cervical ganglion. Brain Res., 1992, v. 570, p. 272–278.
7. Cochard P., Goldstein M. and Black I.B. Initial development of the noradrenergic phenotype in autonomic neuroblasts of the rat embryo in vivo. Dev. Biol., 1979, v. 71, p. 109–114.
8. Ernsberger U. The development of postganglionic sympathetic neurons: coordinating neuronal differentiation and diversification. Auton. Neurosci., 2001, v. 94, p. 1–13.
9. Gibbins I.L., Jobling P., Messenger J.P. et al. Neuronal morphology and the synaptic organisation of sympathetic ganglia. J. Auton. Nerv. Syst., 2000, v. 81, p. 104–109.
10. Goldhawk D.E., Meakin S.O. and Verdi J.M. Subpopulations of rat B21 neuroblasts exhibit differential neurotrophin responsiveness during sympathetic development. Dev. Biol., 2000, v. 218, p. 367–377.
11. Masliukov P.M. and Timmermans J.-P. Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development. Histochem. Cell Biol., 2004, v. 122, p. 201–209.
12. Moriarty M., Gibbins I.L., Potter E.K. and McCloskey D.I. Comparison of the inhibitory roles of neuropeptide Y and galanin in cardiac vagal actions in the dog. Neurosci. Lett., 1992, v. 136, p. 275–279.
13. Roudenok V. Changes in the expression of neuropeptide Y (NPY) during maturation of human sympathetic ganglionic neurons: correlations with tyrosine hydroxylase immunoreactivity. Ann. Anat., 2000, v. 182, p. 515–519.
14. Tyrrell S. and Landis S.C. The appearance of NPY and VIP in sympathetic neuroblasts and subsequent alterations of their expression. J. Neurosci., 1994, v. 14, p. 4529–4547.

Поступила в редакцию 18.05.08
Получена после доработки 20.06.08

NEUROTRANSMITTER COMPOSITION IN THE RAT SUPERIOR CERVICAL AND CELIAC SYMPATHETIC GANGLIA NEURONS DURING THE POSTNATAL DEVELOPMENT

Masliukov P.M., Korzina M.B., Yemanuilov A.I. and Shilkin V.V.

Neurotransmitter composition of the superior cervical ganglion (SCG) and celiac ganglia (CG) neurons was studied immunohistochemically in rats of different ages (newborns, 10-, 12-, 30 and 60-days old). The results obtained indicate that the majority of the neurons in these sympathetic ganglia were tyrosine hydroxylase (TH)-positive from birth onwards. Most of TH-positive neurons were also neuropeptide Y-positive. The percentage of neurons containing neuropeptide Y increased with age from birth till the end of the first month in all the ganglia studied. In the CG, the proportion of neuropeptide Y-positive neurons was significantly greater than in SCG. Only single neurons containing substance P, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and choline acetyltransferase (ChAT) were found in both SCG and CG since the moment of birth. The number of these cells remained unchanged with age. The definitive establishment of the neurotransmitter composition in the sympathetic ganglia studied was complete by the end of the first month of life.

Key words: *sympathetic nervous system, superior cervical ganglion, celiac ganglia, immunohistochemistry, ontogenesis.*

Department of Normal Physiology with the Course of Biophysics, Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy