

*Е.И. Чумасов, Е.С. Петрова и Д.Э. Коржевский*

## ИННЕРВАЦИЯ СЕРДЦА КРЫСЫ (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория функциональной нейроморфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии (руков. — академик РАН В.А. Нагорнев) Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, e-mail: iem@iem.spb.ru

Цель работы — изучение строения нервного аппарата различных отделов сердца с помощью иммуногистохимических методов. Исследование проведено на крысах линии Вистар (n=5). Для селективной окраски синаптических структур использовали выявление синаптофизина (СФ), а для выявления нейрофиламентов в аксонах применяли антитела к их белку (NF-M). Показано, что иннервационные аппараты в тканях сердца распределены неравномерно. Высокая плотность расположения СФ- и NF-M-положительных аксонов обнаружена в миокарде в области атриального синуса, полых и легочных вен, аорты, легочного ствола, в глубоких слоях миокарда предсердий, а также передней и задней стенок желудочков. В области верхушки сердца в миокарде желудочков плотность распределения иммуноположительных аксонов низкая. С помощью антител к СФ в сердце выявляются избирательно только синаптические терминалы эфферентных постганглионарных и парасимпатических вегетативных нервных волокон, а также перичеселлюлярные синапсы на парасимпатических нейронах ганглиев сердца. NF-M-иммуноположительные аксоны, в отличие от СФ-позитивных терминалов, обнаружены не только в миокарде, но и в эпикарде и эндокарде тех же отделов сердца. По мнению авторов, эти аксоны принадлежат афферентным сенсорным и эфферентным преганглионарным миелиновым волокнам ПНС.

**Ключевые слова:** миокард, иннервация, нейрофиламенты, синаптофизин.

Проблема иннервации сердца человека и животных интенсивно разрабатывается на протяжении двух столетий. Различным аспектам нейроморфологии этого органа посвящены ряд обзоров литературы [5–7]. Основные источники иннервации сердца человека и животных, а также топография нервных стволов хорошо известны. Установлены и биохимический статус афферентных, эфферентных парасимпатических и симпатических нервных аппаратов сердца, их локализация в различных отделах сердца, изменения в процессе онтогенеза в норме и патологии [5–7]. Однако остаются еще ряд нерешенных вопросов, касающихся взаимоотношений указанных нервных аппаратов с сосудами и с кардиомиоцитами, не выяснена окончательно локализация различных типов окончаний в желудочках, в стенках магистральных сосудов, выходящих из сердца.

Цель настоящей работы — изучить строение нервных аппаратов сердца с помощью иммуногистохимических методов.

**Материал и методы.** Работа проведена на половозрелых крысах линии Вистар массой 200–250 г (n=5) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Исследовали сердечный комплекс с входящими и выходящими сосудами (аорта, легочный ствол, верхние и нижние полые и легочные вены). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [3]. После заливки в парафин изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм и 20–30 мкм. Для селективного окрашивания синаптических структур выявляли синаптофизин (СФ) — интегральный мембранный

гликопротеин с молекулярной массой 38 килодальтон, который локализуется в пресинаптических пузырьках синапсов ЦНС и ПНС. При этом использовали поликлональные кроличьи антитела (Дако, Дания) и набор для их визуализации (LSAB2, Дако, Дания). Для выявления нейрофиламентов (НФ) и визуализации аксонов применяли поликлональные кроличьи антитела к белку НФ (NF-M — 145 килодальтон, Chemicon, США). Часть срезов для гистологического анализа докрашивали гематоксилином Майера.

**Результаты исследования.** Анализ препаратов показал, что СФ-положительные терминалы (СФПТ) выявляются в различных тканях и отделах сердца крысы и образуют трехмерные сети или сплетения. В пределах предсердий имеются различия в плотности их расположения. Наибольшая концентрация СФПТ наблюдается в устьях полых (на месте синусно-предсердного узла) и легочных вен, а также в миокарде правого и левого предсердий, начиная от корней аорты и легочного ствола, вплоть до фиброзного кольца на границе с желудочками (рис. 1, а); значительное их количество выявляется в ушках предсердий.

На срезах СФПТ имеет вид мелких и крупных гранул, сферической или округлой формы темно-коричневого цвета, располагающихся обособленно на небольшом расстоянии друг от друга либо в виде цепочек, либо длинных непрерывающихся терминалов толщиной от 0,5 до 1,5 мкм, сплошь заполненных зернистостью.

Терминалы нервных сплетений находятся в тесной связи с многочисленными пучками кардиомиоцитов и окружающих их капилляров и следуют

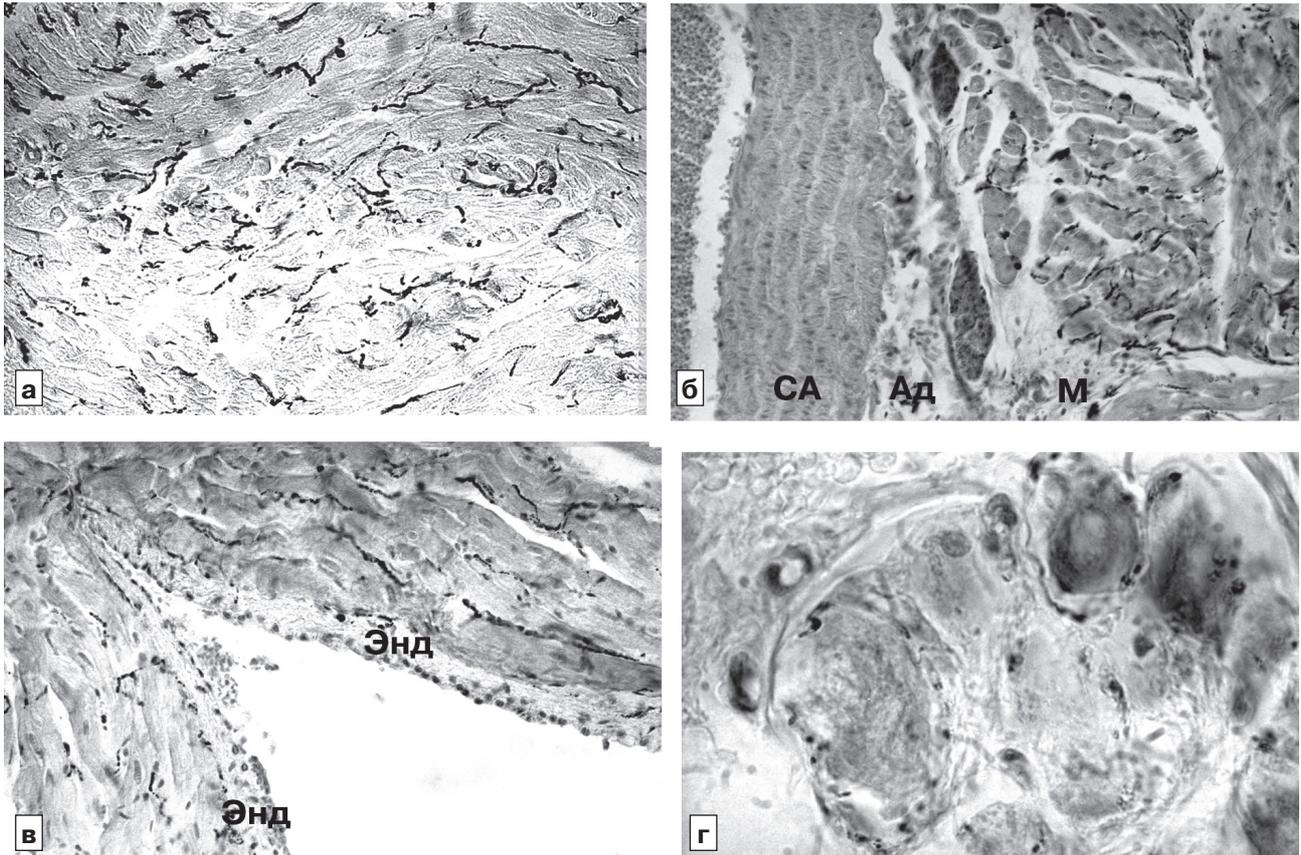


Рис. 1. Синаптофизин-положительные терминалы (СФПТ) в сердце крысы.

а — СФПТ вегетативного нервного сплетения правого предсердия миокарда; б — СФПТ нервных волокон левого предсердия на границе со стенкой аорты; в — СФПТ в миокарде ушка правого предсердия; г — СФПТ вокруг тел нейронов ганглия сердца. СА — мышечная оболочка стенки аорты, Ад — адвентиция стенки аорты; М — миокард левого предсердия; Энд — эндокард. Иммуногистохимический метод выявления СФ. а — об. 10, ок. 10; б, в — об. 20, ок. 10; г — об. 40, ок. 10.

между ними, в основном повторяя их ход. Часть терминалей из сплетения миокарда направляются в рыхлую соединительную ткань адвентициальных оболочек соседних с миокардом магистральных сосудов (аорты, легочного ствола, полых вен). В средней оболочке перечисленных магистральных сосудов (в области выхода из сердца) СФПТ не выявляются (см. рис. 1, б). В то же время, вокруг более мелких сосудов сердца, например, венечных артерий и их разветвлений, артериовенозных анастомозов СФПТ очень много. Они оплетают эти сосуды, образуя периваскулярные сплетения, которые переходят на артериолы, а затем и на капилляры. В глубоких слоях миокарда предсердий, а также передней и задней стенки желудочков многочисленны терминальные веточки следуют в основном вдоль длинных пучков кардиомиоцитов. При этом они располагаются в прослойках рыхлой соединительной ткани и находятся в тесной связи, с одной стороны, со стенкой капилляров, а с другой — с базальной мембраной кардиомиоцитов. Исследование миокарда желудочков в апикальной части сердца показало, что по сравнению

с остальными зонами СФПТ в ней немногочисленны. Здесь встречаются длинные терминалы по ходу мелких артериальных сосудов и капилляров (см. рис. 1, в). СФПТ очень избирательно выявляются также в интрамуральных ганглиях, располагающихся в сплетениях между аортой и легочным стволом, а также во внутрисердечных нервных узлах. Они имеют вид перицеллюлярных синаптических аппаратов, располагающихся вокруг перикарионов мелких и крупных нейронов (см. рис. 1, г).

Иммунореактивные NF-M-положительные аксоны нервных волокон хорошо выявляются в крупных стволах и пучках аортально-пульмонального сплетения (рис. 2, а), а также во всех оболочках сердца. Диаметр аксонов в стволах и нервных пучках варьирует от 1 до 5 мкм и более. Они имеют четкие контуры, окрашиваются в темно-коричневый цвет и прослеживаются на значительном расстоянии. По мере ветвления стволы и пучков и образования ими внутрисердечного сплетения диаметр аксонов уменьшается. Установлено, что среди многочисленных толстых волокон в тех же самых стволыках и пучках нахо-

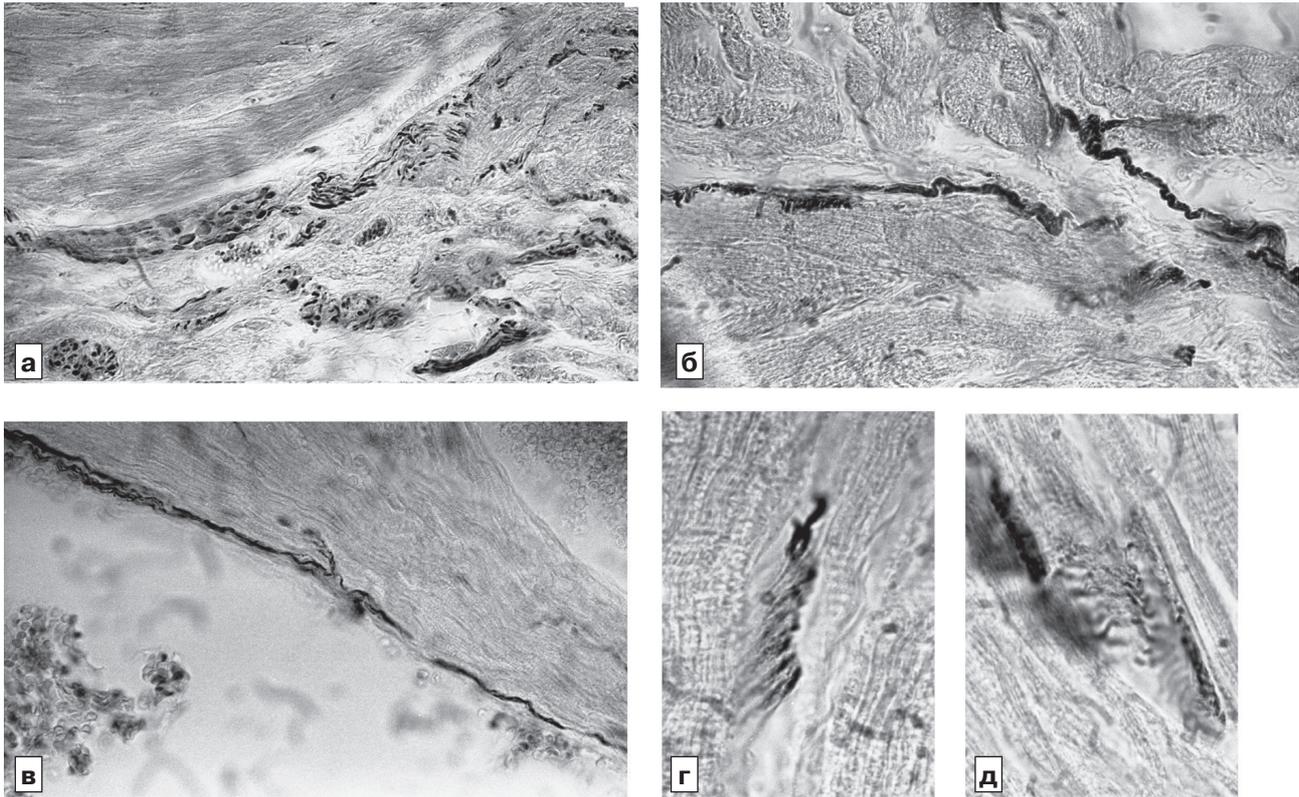


Рис. 2. NF-M-положительные аксоны в сердце крысы.

а — в нервных стволиках и пучках аортально-сердечного сплетения; б — в миокарде правого предсердия; в — в эндокарде; г, д — взаимоотношения лентообразных NF-M-положительных аксонов с тяжами кардиомиоцитов в левом желудочке. Иммуногистохимический метод выявления нейрофиламентов. а — об. 20, ок. 10; б, в — об. 40, ок. 10; г, д — об. 100, ок. 10.

дятся плотно расположенные тяжи тонких аксонов, которые, вероятно, относятся к волокнам вегетативной нервной системы и не окрашиваются данным методом. NF-M-положительные аксоны обнаружены в различных отделах предсердий и желудочков: в эпикарде, миокарде и эндокарде, где они образуют широкопетлистую сеть. Многие из них прослеживаются между кардиомиоцитами и капиллярами на большом расстоянии. Часть из них делятся и отдают тонкие боковые веточки, идущие в различных направлениях. Однако никаких специализированных нервных окончаний выявлено не было. Примечательно, что в глубоких слоях миокарда (в основном желудочков) часто приходилось наблюдать, как тонкие пучки аксонов, следующие поперек тяжей кардиомиоцитов, веерообразно расслаиваются и охватывают эти тяжи наподобие ленты. При их расслоении легко определяется число уплощенных аксонов (иногда оно достигает 10–20) (см. рис. 2, г, д). Наибольшая плотность NF-M-позитивных аксонов в составе сплетений обнаруживается в миокарде и эндокарде предсердий, включая их ушки. Значительно меньшее количество таких аксонов встречается в миокарде и эндокарде желудочков.

**Обсуждение полученных данных.** Известно, что терминальные вегетативные сплетения в сердце формируются за счет парасимпатических, симпатических и афферентных нервных волокон. Одни из них, парасимпатические постганглионарные волокна, образованы за счет аксонов внутрисердечных нейронов, другие — постганглионарные симпатические — за счет нейронов верхнего шейного и звездчатого ганглиев. Третьи — афферентные чувствительные и эфферентные преганглионарные — являются терминалями чувствительных нейронов ганглия блуждающего нерва и нейронов, расположенных вблизи ромбовидной ямки продолговатого мозга [2, 5–7]. Все эти волокна имеют различный медиаторный статус. Парасимпатические эфферентные и афферентные волокна содержат ацетилхолин, эфферентные симпатические — норадреналин, рецепторные — кроме ацетилхолина, субстанцию Р [1, 5, 7, 12]. В связи с этим в сердце обнаруживаются 3 типа нервных окончаний: синаптические — эфферентные, образованные парасимпатическими и симпатическими постганглионарными волокнами, иннервирующими сосуды и миокард; эфферентные синапсы перичеселлюлярных аппаратов нейронов внутрисердечных ганглиев, обра-

зованные преганглионарными волокнами, и чувствительные нервные окончания нейронов ганглиев блуждающего нерва.

Имеются немногочисленные работы, посвященные иммуногистохимическому исследованию иннервации сердца и выполненные сходными методами. Одни исследователи [8–10] изучали распределение только СФ-позитивных терминалей в миокарде предсердий и желудочков морской свинки, а другие — в работе [14], посвященной изучению иннервации миокарда предсердий человека при сахарном диабете, использовали антитела к белку НФ. В нашей работе были использованы оба эти высокоизбирательные метода: один из них выявляет только синаптические структуры, локализующиеся в варикозных нервных терминалях, другой — аксоны нервных волокон. Сопоставление полученных результатов позволило предположить природу выявленных нервных аппаратов.

По нашему мнению, обнаруженные синаптические структуры в виде перичеллюлярных сплетений вокруг нейронов интрамуральных ганглиев сердца являются, безусловно, парасимпатическими СФПТ преганглионарных волокон. СФПТ в вегетативном нервном сплетении миокарда и вокруг сосудов микроциркуляторного русла сердца по медиаторной принадлежности дифференцировать использованными методами невозможно: во-первых, потому, что симпатические и парасимпатические постганглионарные аксоны, как известно, следуют вместе в одних и тех же тяжах нейролеммоцитов [2, 12, 15]; во-вторых, по нашим данным, в отличие от СФПТ, претерминальные и проводниковые отделы тех же самых аксонов, следующих в пучках и стволиках (структурах, изолированных периневрием от окружающих тканей), как правило, не выявляются. Это связано, по-видимому, с тем, что вегетативные аксоны отличаются по своему электронно-микроскопическому строению от аксонов преганглионарных парасимпатических и афферентных чувствительных волокон. В аксонах первых преобладают нейротрубочки и пузырьки, а у вторых — НФ. Следовательно, все СФПТ, выявленные нами в миокарде и на нейронах его ганглиев, являются истинно терминальными структурами, содержащими синаптические пузырьки, которые, как известно, находятся в состоянии транспорта или локализируются в варикозных расширениях постганглионарных симпатических и парасимпатических аксонов. Следует отметить, что чувствительные нервные окончания, которые, согласно данным литературы, в большом количестве присутствуют в миокарде и, особенно, в эндокарде всех отделов

сердца [5–7, 11], с помощью данных методов не обнаружены.

Таким образом, результаты настоящей работы, полученные с помощью иммуногистохимических методов, согласуются с данными литературы [1, 7, 11–13] о том, что иннервационные аппараты в миокарде распределены неравномерно. Нами показано, что у крысы наибольшая плотность расположения СФПТ и NF-M-положительных аксонов обнаружена в миокарде в области входа и выхода магистральных сосудов: вокруг атриального синуса, полых и легочных вен, аорты, легочного ствола, в глубоких слоях миокарда предсердий (особенно правого), передней и задней стенок желудочков. Значительно меньшее их количество найдено в миокарде желудочков в области верхушки сердца. С помощью антител к СФ в сердце крысы выявляются избирательно синаптические терминали эфферентных постганглионарных симпатических и парасимпатических вегетативных нервных волокон, а также синаптические терминали перичеллюлярных аппаратов парасимпатических нейронов внутрисердечных ганглиев. NF-M-положительные аксоны, обнаруженные в тех же отделах сердца, вероятнее всего, принадлежат афферентным рецепторным и эфферентным преганглионарным миелинизированным волокнам ПНС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Говырин В.А. и Леонтьева Г.Р. Медиаторные механизмы регуляции кровеносных сосудов. В кн.: Физиология кровообращения. Регуляция кровообращения. Л., Наука, 1985, с. 154–185.
2. Джеймс Т.Н. Повреждения нервного аппарата сердца и внезапная смерть. В кн.: Внезапная смерть. М., Медицина, 1982, с. 151–175.
3. 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.
4. Лаврентьев Б.И. Теория строения вегетативной нервной системы. М., Медицина, 1983.
5. Ноздрачев А.Д. и Чумасов Е.И. Периферическая нервная система. СПб., Наука, 1999.
6. Хабарова А.Я. Иннервация сердца и кровеносных сосудов. Л., Наука, 1975.
7. Швалев В.Н., Сосунов А.А. и Гуски Г. Морфологические основы иннервации сердца. М., Наука, 1992.
8. Aidonis I., Metz J., Gerstheimer F. et al. Significance of cardiac innervation on spontaneous ventricular arrhythmias elicited by left stellate ganglion stimulation in dogs 4 days after myocardial infarction: comparison of two experimental models. Basic. Res. Cardiol., 1993, v. 88, № 2, p. 155–166.
9. Klemm M.F., Wallace D.J. and Hirst G.D. Distribution of synaptic boutons around identified neurons lying in the cardiac

- plexus of the guinea-pig. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1997, v. 66, № 3, p. 201–207.
10. Metz J., Gerstheimer F.P. and Herbst M. Distribution of synaptophysin immunoreactivity in guinea pig heart. *Histochemistry*, 1986, v. 86, № 2, p. 221–224.
  11. Papka R.E. Types of nerve terminals in fetal and neonatal rabbit myocardium. *Experientia*, 1978, v. 34, № 5, p. 655–658.
  12. Papka R.E. Development of innervation to the ventricular myocardium of the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1981, v. 13, № 2, p. 217–228.
  13. Papka R.E., Furness J.B., Della N.G. et al. Time course of effect of capsaicin on ultrastructure and histochemistry of substance P-immunoreactive nerves associated with cardiovascular system of the guinea-pig. *Neuroscience*, 1984, v. 12, № 4, p. 1277–1292.
  14. Park A.M., Armin S., Azarbal A. et al. Distribution of cardiac nerves in patients with diabetes mellitus: an immunohistochemical postmortem study of human hearts. *Cardiovasc. Pathol.*, 2002, v. 11, № 6, p. 326–331.
  15. Zypen E. van der. *Anatomie des sympathischen Nervensystems*. Vasa, 1977, Bd. 6, № 2, S. 115–123.

Поступила в редакцию 02.12.08

#### **RAT HEART INNERVATION (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)**

*Ye.I. Chumasov, Ye.S. Petrova and D.E. Korzhevskiy*

The aims of the present study were to investigate the structure of the nervous apparatus in different heart regions using the

immunohistochemical methods. The study was performed in Wistar rats (n=5). For selective staining of synaptic structures, synaptophysin (Syn) demonstration was used, while neurofilament proteins (NF-M) were used to detect axonal neurofilaments. The innervation apparatuses in the heart were shown to be unevenly distributed. High density of Syn- and of NF-M-positive axons was found in the myocardium near the atrial sinus, vena cava superior and inferior, pulmonary veins, aorta, truncus pulmonalis, as well as in the deep layers of atrial myocardium, and in the myocardium of anterior and posterior ventricle walls. In the heart apex, within the ventricular myocardium, the density of immunopositive axons was low. Using the antibodies against Syn, only the synaptic terminals of the efferent postganglionic nerve fibers and of the parasympathetic vegetative nerve fibers were selectively demonstrated in the heart, as well as the pericellular synapses on the parasympathetic neurons of intracardiac ganglia. NF-M-immunopositive axons, unlike Syn-positive terminals, were found not only in the myocardium, but also in the epicardium and the endocardium within the same regions of the heart.

The authors believe that these axons belong to afferent sensory and efferent preganglionic myelinated nerve fibres of PNS.

**Key words:** *myocardium, innervation, neurofilaments, synaptophysin.*

Laboratory of the Functional Neuromorphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg.