

**Е. И. Чумасов, Е. А. Колос,  
Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский**

# **ИММУНОГИСТОХИМИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

*Под редакцией Д. Э. Коржевского*

Санкт-Петербург  
СпецЛит  
2020

УДК 576.08:611.83  
И53

Авторы:

**Чумасов Евгений Иванович** — доктор биологических наук, профессор лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

**Колос Елена Андреевна** — научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

**Петрова Елена Сергеевна** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

**Коржевский Дмитрий Эдуардович** — доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины (ФГБНУ «ИЭМ»)

Рецензент:

**Н. И. Чалисова** — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Института физиологии им. И. П. Павлова РАН

**И53 Иммуногистохимия периферической нервной системы / Е. И. Чумасов, Е. А. Колос, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский / под ред. Д. Э. Коржевского. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2020. — 111 с. ISBN 978-5-299-01086-2**

Монография подготовлена в рамках выполнения темы НИР лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ».

Цель книги состоит в выявлении возможностей и анализе результатов использования современных иммуногистохимических подходов при проведении исследований иннервации внутренних органов лабораторных животных и человека.

Сегодня методы иммуногистохимии занимают важное место среди методов морфологической диагностики. При этом отечественная методическая литература, посвященная их применению, ограничивается небольшим числом руководств, в которых отсутствуют сведения об иммуноморфологии органов периферической нервной системы. Настоящая книга сочетает в себе данные о современных иммуногистохимических маркерах, применяемых для изучения органов периферической нервной системы в норме и при патологии, со сведениями о результатах их использования для решения конкретных научных задач. Она адресована широкому кругу специалистов — кардиологам, эндокринологам, гастроэнтерологам, неврологам, фармакологам, патологам и научным работникам, применяющим гистологические методы исследования в своей работе.

УДК 576.08:611.83

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Условные сокращения</b> .....	4
<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1.</b> Изучение иннервации сердца ( <i>Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	7
1.1. Изучение особенностей нервных аппаратов сердца крысы на разных этапах постнатального онтогенеза .....	8
1.2. Распределение PGP 9.5-иммунопозитивных нервных волокон в сердце человека .....	15
<b>Глава 2.</b> Иннервация легочных вен крысы ( <i>Е. И. Чумасов, Д. Э. Коржевский</i> ) ..	21
<b>Глава 3.</b> Иммуноморфологический анализ иннервации хромаффинных клеток параганглиев артерий и сердца млекопитающих ( <i>Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	25
<b>Глава 4.</b> Особенности иннервации надпочечника ( <i>Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	36
<b>Глава 5.</b> Эфферентная иннервация сосудов и бронхов легкого крысы ( <i>Е. И. Чумасов, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	48
<b>Глава 6.</b> Нервные аппараты поджелудочной железы ( <i>Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	54
6.1. Иммуногистохимические особенности островков Лангерганса и нервных элементов поджелудочной железы крысы при старении ..	61
6.2. Структурная организация интрапанкреатических ганглиев и межмышечного нервного сплетения двенадцатиперстной кишки ..	66
<b>Глава 7.</b> Исследование клеток спинномозгового ганглия крысы с помощью иммуногистохимических методов ( <i>Е. А. Колос</i> ) .....	76
<b>Глава 8.</b> Изучение нейрогенеза в спинномозговом ганглии крысы с помощью иммуногистохимических маркеров дифференцировки ( <i>Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	84
<b>Глава 9.</b> Иммуногистохимические маркеры для структур перифериче- ской нервной системы ( <i>Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i> ) .....	92
<b>Литература</b> .....	99

## УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АХК	—	адренергические хромаффинные клетки
АЦХ	—	ацетилхолин
ВНС	—	вегетативная нервная система
ВШСГ	—	верхний шейный симпатический ганглий
ГМК	—	гладкомышечные клетки
ДОФА	—	дигидроксифенилаланин
ДПК	—	двенадцатиперстная кишка
ИГХ	—	иммуногистохимия
КМ	—	кардиомиоцит
ЛВ	—	легочные вены
МВН	—	мозговое вещество надпочечника
НАХК	—	норадренергические хромаффинные клетки
НК	—	нервные клетки
НП	—	надпочечник
ОЛ	—	островки Лангерганса
ПЖ	—	поджелудочная железа
ПНС	—	периферическая нервная система
ПРФ	—	периферин
СМГ	—	спинномозговой ганглий
СФ	—	синаптофизин
СФПТ	—	синаптофизин-позитивные терминалы
ХК	—	хромаффинные клетки
ЦНС	—	центральная нервная система
ЭП	—	эпикард
5-НТ	—	5-гидрокситриптамин, серотонин
$\beta$ -Т-III	—	бета-тубулин III
CGRP	—	кальцитонин-ген-связанный пептид
ChAT	—	холинацетилтрансфераза
DCX	—	даблкортин
GAL	—	галанин
NeuN	—	ядерный белок нервных клеток
NF	—	нейрофиламенты
NF-H	—	высокомолекулярные белки нейрофиламентов
NF-L	—	низкомолекулярные белки нейрофиламентов
NF-M	—	среднемолекулярные белки нейрофиламентов
NOS	—	NO-синтаза
NPY	—	нейропептид Y
PACAP	—	полипептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза
PCNA	—	ядерный антиген пролиферирующих клеток
SP	—	субстанция P
TH	—	тирозингидроксилаза
VIP	—	вазоактивный интестинальный полипептид

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема иннервации различных органов и тканей привлекала и продолжает привлекать внимание ученых различных специальностей — клиницистов, хирургов, физиологов, фармакологов, морфологов — своей актуальностью фундаментального и прикладного значения. Несмотря на то что эта проблема разрабатывается на протяжении многих десятилетий, некоторые вопросы, касающиеся развития нервных аппаратов (ганглиев, нервных проводников и нервных окончаний) в различных органах животных и человека в онтогенезе, их топографии, структурно-функциональных особенностей в норме и при патологии, до сих пор остаются недостаточно изученными. Данная монография знакомит читателя с результатами современных исследований иннервации внутренних органов, которые необходимо учитывать как при экспериментальных исследованиях, так и при анализе патогенеза заболеваний животных и человека.

В большинстве ранее выполненных экспериментальных и клинических исследований для изучения иннервации использовались классические нейроморфологические методы. В специальных книгах Б. Ромейса, Э. Пирса, Г. А. Меркулова и т. д., хорошо известных всем исследователям и ставших классическими руководствами для морфологов, представлено большое количество нейрогистологических методов, часть из которых активно применяется и в современной научной практике.

Более 150 лет для изучения тканей нервной системы на светооптическом уровне используются соли тяжелых металлов (в основном азотнокислые серебро, реже золото, соли свинца, соли кобальта). Как правило, восстановленные металлы связываются с белками нейротрубочек и нейрофиламентов. Процесс связывания металлов с белками нервных структур называют импрегнацией. Большое значение для изучения морфологии нейронов, их классификации, анализа цитоархитектоники имеет также метод Ниссля, позволяющий выявлять хроматофильное вещество, представляющее собой скопления цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулула.

Огромный вклад в мировую науку изучения структуры и функции нервной системы с помощью импрегнационных методов внесла целая плеяда выдающихся зарубежных и отечественных нейрогистологов. Изучению нервной ткани человека и животных посвящены фундаментальные работы К. Гольджи, С. Рамон-и-Кахаля, Ф. Ниссля. Классические исследования, посвященные вегетативной нервной системе человека и животных, проведены А. С. Догелем, Б. И. Лаврентьевым, Б. С. Дойниковым, Ю. М. Жаботинским, Н. Г. Колосовым, А. Д. Ноздрачевым, Д. М. Голубом, В. Н. Майоровым, их учениками и последователями. Существенный вклад в изучение нервной системы беспозвоночных животных внесен академиком А. А. Заварзиным, длительное время возглавлявшим отдел общей морфологии Института экспериментальной медицины.

Наряду с импрегнационными методами с конца девятнадцатого столетия для выявления нервных структур стала применяться методика суправитальной окраски метиленовым синим по П. Эрлиху, разработанная им в 1885 г. Техника этой окраски затем неоднократно модифицировалась различными учеными: А. С. Догелем, В. П. Воробьевым, А. Л. Шабадашем и др. Помимо этого в нейроморфологии широко применяются и такие методы, как фазово-контрастная микроскопия, поляризационная микроскопия, электронная микроскопия, гистохимические методы.

Несмотря на большие возможности перечисленных методов, все они не лишены недостатков. Положительные результаты при импрегнации часто зависят исключительно от специфики фиксирующих жидкостей и заливочного материала. Не всегда возможно выявление в одном поле зрения одновременно всех тканевых компонентов из-за того, что импрегнированные серебром или золотом срезы часто не подлежат докраске обычными гистологическими красителями. Для получения хорошей прижизненной окраски метиленовым синим необходимо использовать нефиксированный материал и химически чистые реагенты, требуется также строгое соблюдение температурного режима, рН и т. д. Результат не всегда оказывается стабильным, его трудно зафиксировать в виде постоянного препарата. Импрегнационные и суправитальные методы характеризуются низкой степенью воспроизводимости. Что касается такого высокоинформативного метода, как электронная микроскопия, то при всех его достоинствах, проявляющихся при изучении ультраструктуры клеток, он имеет комплекс недостатков (дорогое оборудование, значительные затраты времени на пробоподготовку, высокотоксичные реагенты), который ограничивает широкое применение электронной микроскопии в научных исследованиях.

В настоящее время наиболее информативными, адекватными и удобными в использовании являются методы иммуногистохимии, позволяющие быстро получать результат, что важно не только при экспериментальных исследованиях, но и для разработки новых способов диагностики.

Сотрудниками Лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы ФГБНУ «ИЭМ» в последние годы активно проводится исследование специфичности и применимости новых иммуногистохимических маркеров для изучения структур периферической нервной системы. За это время авторами настоящей монографии выпущено несколько десятков научных статей, в которых анализируются особенности иннервации различных внутренних органов лабораторных животных и человека. Настоящая монография представляет собой первое издание, обобщающее результаты исследований ПНС, полученные сотрудниками Лаборатории с использованием современных иммуногистохимических подходов.

## Глава 1

### ИЗУЧЕНИЕ ИННЕРВАЦИИ СЕРДЦА

Сердце млекопитающих и особенно человека является одним из наиболее иннервированных органов. Некоторые авторы не зря называют сложный комплекс нервных аппаратов сердца «маленьким мозгом» (Ardell J. L., 2004; Brack K. E., 2015). Значительный вклад в решение многих вопросов, связанных с иннервацией сердца человека и животных, внесли отечественные ученые. В. П. Воробьев одним из первых отечественных анатомов путем макро- и микроскопической препаровки нашел и описал топографию шести нервных сплетений в эпикарде разных отделов сердца человека. Он одним из первых выделил внеорганные (в околосердечной области) и внутриорганные (внутрисердечные) нервные сплетения в эпикарде (ЭП) (Воробьев В. П., 1917). В прошлом столетии с помощью классических методов импрегнации серебром и гистохимии отечественными нейрогистологами Б. И. Лаврентьевым, А. Я. Хабаровой, Р. М. Рейдлер и др. (Лаврентьев Б. И., 1983; Рейдлер Р. М., 1971; Хабарова А. Я., 1975, Швалев В. Н. [и др.], 1992) были описаны различные нервные структуры сердца (ганглии, хромаффинные параганглии, нервные сплетения из холинергических и симпатических нервных пучков, различные типы рецепторных окончаний).

В последние десятилетия с внедрением в нейробиологии новых более точных и прецизионных методов нейроиммуногистохимического анализа многие вопросы пересматриваются и уточняются. Большое внимание уделяется вопросам морфологии нервных сплетений сердца млекопитающих. Ранее три нервных сплетения, различающихся по морфологии, были описаны ИГХ-методами в миокарде левого желудочка человека, а у крысы — в эпикарде, миокарде и эндокарде (Чумасов Е. И. [и др.], 2009; 2013; 2018). По другим данным, количество внутрисердечных нервных сплетений достигает 5–7 в зависимости от топографии эпикарда, количества ганглиев, биохимического статуса нейронов, наличия немиелинизированных и миелинизированных нервных волокон и окончаний (Batulevicius D. [et al.], 2008; Saburkina I. [et al.], 2010, 2014).

Несмотря на то что иннервация сердца изучается на протяжении нескольких десятилетий, многие вопросы, касающиеся последовательности развития нервных сплетений в различных отделах сердца в онтогенезе, выяснения источников иннервации сердца, нейромедиаторной природы аксонов парасимпатической и симпатической нервной системы и др., остаются малоизученными. До сих пор не решен вопрос о последовательности развития парасимпатических и симпатических нервных структур в сердце млекопитающих. Обсуждаются различные точки зрения. Одни пола-

гают, что холинергические и адренергические нервные аппараты сердца развиваются почти одновременно, другие считают, что сперва вырастают холинергические, либо симпатические (Афанасьев Ю. И., Горячкина В. Г., 2011; Кнорре А. Г., Суворова Л. В., 1984). Отмечается, что вращание нервных волокон в сердце идет поэтапно, параллельно с формированием его отделов. По данным литературы, сначала появляются нервные волокна в правом предсердии, затем в левом. Такая же гетерохронность развития наблюдается в желудочках. Известно, что источниками внеорганных сплетений сердца служат ветви обоих вагосимпатических стволов, позже появляются нервные волокна верхних грудных сегментов симпатической цепи, верхнего шейного и звездчатого ганглиев и отростки афферентных нейронов спинномозговых ганглиев (Ardell J. L., 2004; Brack K. E., 2015).

Малоизученным остается вопрос о развитии иннервации эпикарда и возможной роли его нервного сплетения в васкулогенезе. R. W. Dettman [et al.], T. Mikawa и R. G. Gourdie доказали, что эмбриональный эпикард (*проэпикард*) является источником прогениторных клеток, которые высеваются в субэпикардальное пространство, а из мезенхимальных предшественников развиваются гладкомышечные клетки, эндотелиоциты и фибробласты (Dettman R. W. [et al.], 1998; Mikawa T., Gourdie R. G., 1996). Последние мигрируют в миокард и участвуют в развитии коронарных сосудов. В обзорах N. Smart [et al.] и K. J. Lavine и D. M. Ornitz обсуждаются механизмы процессов контроля сложного каскада сигнальных путей (Lavine K. J., Ornitz D. M., 2009; Smart N. [et al.], 2007). В миокарде обнаружено большое число ангиогенных факторов, которые, как предполагается, управляют ростом коронарных сосудов не только в эмбриогенезе, но и в постнатальном периоде. Авторы наблюдали высокую экспрессию различных факторов роста фибробластов (FGF-2, FGF-4), VEGFA и VEGFB, ангиопоэтинов (ANG1 и ANG2), тимозина  $\beta$ 4, экспрессируемых в субэпикарде и миокарде в течение роста сосудов. В механизмах васкуло- и ангиогенеза, по современным данным, участвуют также продукты протеолиза молекул внеклеточного матрикса (Банин В. В., 2006). К сожалению, в этих и многих других работах отсутствуют данные о возможных факторах нервного влияния на процессы васкулогенеза.

### **1.1. Изучение особенностей нервных аппаратов сердца крысы на разных этапах постнатального онтогенеза**

В настоящем подразделе представлены данные о формировании нервных сплетений сердца, медиаторной природе их нервных волокон и взаимосвязи нервных структур и кровеносных сосудов эпикарда на разных стадиях постнатального развития крысы.

Анализ срезов, сделанных через все сердце новорожденной крысы, после проведения иммуногистохимического выявления нейронального мар-



кера PGP 9.5 показал неравномерность распределения нервных структур (рис. 1). Основная масса их сосредоточена в этот срок вне органа, в области корней или основания магистральных сосудов, и меньшая — представлена развивающимся внутриорганным эпикардиальным сплетением. В межорганный рыхлой соединительной ткани и развивающейся жировой клетчатке постоянно обнаруживаются один-два относительно крупных (от 200 до 350 мкм) округлой или неправильной формы ганглиев, расположенных между стволом аорты, правым ушком и легочной артерией. Более мелкие микроганглии, тяжи и группы нервных клеток (НК) встречаются на задней стенке венозного синуса, в основании краниальной и каудальной полых вен, а также на задней стенке левого предсердия в области легочных вен. Ганглии состоят из компактно расположенных малодифференцированных нейроцитов и небольшого числа дифференцирующихся нейробластов (13,5–20 мкм) (рис. 2, а, б). Через 2 нед. размеры многих клеток увеличиваются почти в два раза. Вокруг тел некоторых нервных клеток с помощью реакции на синаптофизин обнаруживаются перичеселлюлярные синаптические аппараты, образованные преганглионарными парасимпатическими нервными волокнами (рис. 2, б).

На поперечных срезах между аортой и легочной артерией часто встречаются элементы вагосимпатического ствола. Отходящие от него многочисленные пучки нервных волокон объединяются с пучками аксонов нервных клеток перечисленных интрамуральных узлов, и в результате образуются смешанного типа нервные сплетения вокруг стенок магистральных сосудов околосердечной области. Вблизи ганглиев и нервных пучков, а в некоторых случаях и внутри них обнаруживаются небольшие скопления мелких гранулярных клеток, представляющих собой нейроэндокринные, хромоаффинные клетки (ХК) (рис. 2, б, в). Следует отметить, что они, как и нейроны интрамуральных парасимпатических ганглиев, дают положительную реакцию на PGP 9.5.

С помощью реакции на тирозингидроксилазу (ТН<sup>+</sup>) были избирательно выявлены также и симпатоадреналовые компоненты сердца. Одни из них представлены различного диаметра пучками симпатических аксонов, встречающимися по отдельности или в составе пучков смешанного типа основного сплетения, расположенного в межорганный соединительной ткани. Еще одним ТН<sup>+</sup>-компонентом, нередко присутствующим в этой области сердца, являются ХК, которые, как известно, способны синтезировать катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин). Симпатические ганглии в околосердечной области сердца практически отсутствуют, только изредка встречаются небольшие группы ТН<sup>+</sup>-нейронов.

Следует подчеркнуть, что иннервация тканей самого сердца, включая предсердия и желудочки, у новорожденных крыс слабо выражена. Морфологические признаки продолжающегося интенсивного роста аксонов

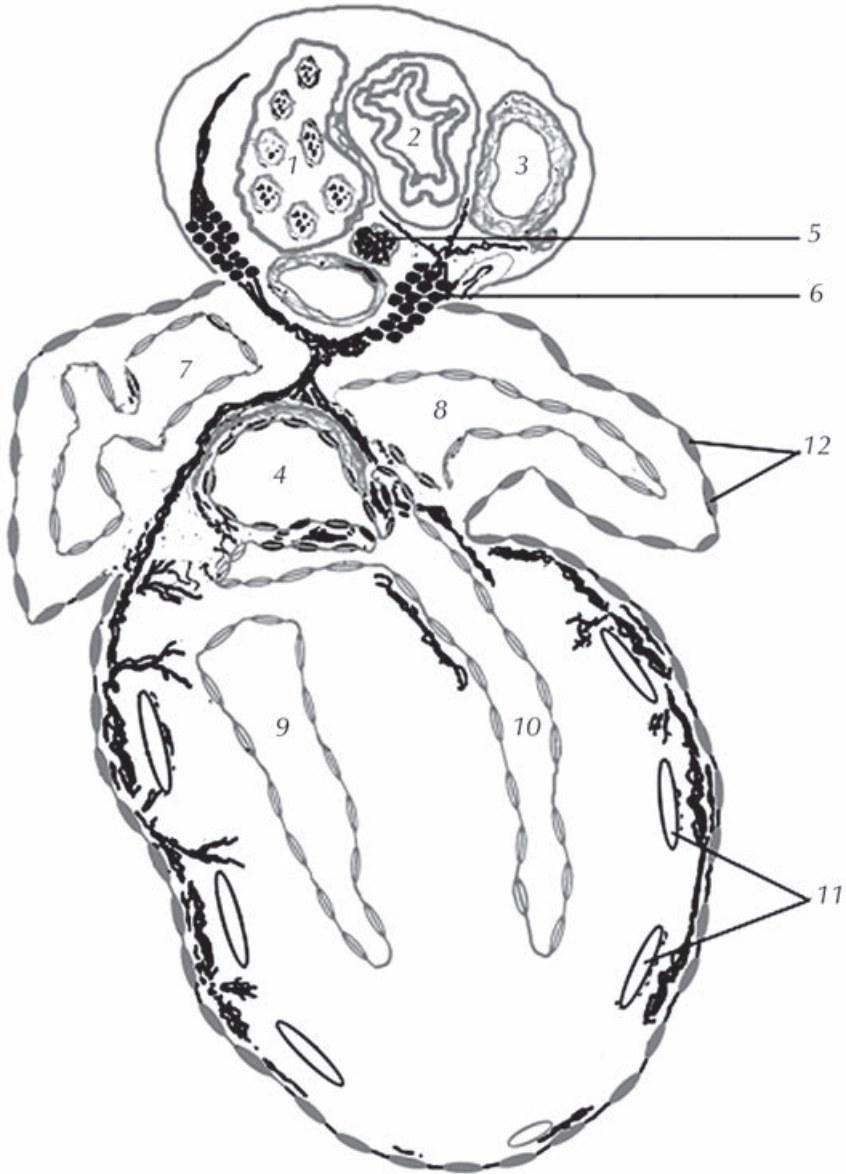


Рис. 1. Реконструкция расположения нервных аппаратов в сердце новорожденной крысы по гистологическим срезам, окрашенным с использованием пан-нейронального маркера PGP 9.5:

1 — трахея; 2 — пищевод; 3 — легочная артерия; 4 — аорта; 5 — вагосимпатический ствол; 6 — ганглии; 7 — правое предсердие; 8 — левое предсердие; 9 — правый желудочек; 10 — левый желудочек; 11 — капилляры; 12 — эпителий эпикарда (мезотелий); черным цветом выделены нервные структуры, дающие положительную реакцию на PGP 9.5

*Научное издание*

**ИММУНОГИСТОХИМИЯ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

*Под редакцией Д. Э. Коржевского*

Редактор *Пугачева Н. Г.*  
Корректор *Полушкина В. В.*  
Компьютерная верстка *Габерган Е. С.*

Подписано в печать 07.12.2020. Формат 70 × 100<sup>1/16</sup>.

Печ. л. 7

Тираж 300 экз. Заказ № 12

ООО «Издательство „СпецЛит“».  
190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15—17, литер В, пом. 231  
Тел./факс: (812) 495-36-12, 495-36-09  
<http://www.speclit.su>

Отпечатано в АО «Т 8 Издательские технологии».  
109316, Москва, Волгоградский пр., д. 42, корп. 5, к. 6