

СТРУКТУРНЫЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА СТАНОВЛЕНИЯ ИННЕРВАЦИИ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ И ЛЕГКИХ КРЫС

© 2025 г. Е. И. Чумасов^{1, 2, *}, Е. С. Петрова¹, Д. Э. Коржевский¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ua1ct@mail.ru

Поступила в редакцию 30.01.2025 г.

После доработки 06.03.2025 г.

Принята к публикации 07.03.2025 г.

Цель настоящей работы состояла в иммуногистохимическом исследовании нервных аппаратов и мышечных структур легкого крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза. Объектами изучения служили экстрамуральные и интрамуральные отделы легкого (трахея, главные бронхи и долевые отделы легкого, включая респираторный отдел) крыс Вистар в возрасте от одних до четырнадцатых суток. Нервные структуры изучали с помощью иммуногистохимических маркеров: белок PGP 9.5, тирозингидроксилазу, синаптофизин; для выявления мышечных клеток использовали актин саркомерный. Установлено, что у новорожденных крыс плотность распределения холинергических структур (парасимпатических ганглиев, микроганглиев нервных сплетений и терминальных синаптических сетей) преобладает над катехоламинергическими (симпатическими нейронами и пучками постганглионарных волокон). Выраженные ганглиозные сплетения имеются вокруг трахеи и главных бронхов. Обнаружена закономерность изменения иннервации тканей в стенке бронхов легкого в кранио-каудальном направлении: для проксимальных отделов характерна высокая плотность распределения нервных сплетений, в альвеолярных областях — их отсутствие. Прослежены тесные взаимоотношения основного терминального нервного сплетения с клетками мышечной ткани стенки бронхов разных калибров вплоть до бронхиол. Отмечена слабая иннервация клеточных элементов в дольках вокруг легочных мешочков и отсутствие нервных терминалей в межальвеолярных септах. С помощью реакции на белок S100β в альвеолярном отделе выявлены отростчатые клеточные элементы, морфологически сходные с глиальными клетками Кахала, без включенных в их цитоплазму аксонов. Отмечена важная особенность: мышечная стенка магистральных легочных вен средостения и краниального отдела легкого состоит из пучков кардиомиоцитов, а в альвеолярных отделах стенка легочной вен мелкого калибра — преимущественно из гладких миоцитов и образованных ими сфинктеров. Вопросы о различиях гистологического строения и иннервации приносящих и обменных артериальных и венозных сосудов микроциркуляторного русла легкого, требуют дальнейшего специального изучения. Отмечено отсутствие в исследованном материале на ранних сроках развития бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани, характерной для половозрелых животных. Установлена синхронность возникновения межнейронных и нейро-мышечных синапсов, имеющих значение для регуляции начала процесса дыхания у животного.

Ключевые слова: легкие крысы, трахея и бронхи, нервные структуры, белок PGP 9.5, синаптофизин, тирозингидроксилаза, актин, онтогенез, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0044452925020033, EDN: IEVTRC

ВВЕДЕНИЕ

Важность изучения иннервации легких продиктована распространенностью легочных заболеваний у млекопитающих и человека. Изучаются механизмы изменений нервных структур при нарушении иннервации легких при сердечно-легочной недостаточности, хроническом бронхите, эмфиземе, легочной гипертензии, фибрилляции предсердий и др. [1–3]. Следует отметить, что актуальность

морфологических исследований легких животных и человека продиктована также недостатком фундаментальных знаний о гистологическом строении и развитии структур нескольких, тесно связанных между собой систем: кровеносных сосудов малого круга кровообращения, эпителия воздухоносных путей и иннервирующих их структур (нервной и глиальной тканей). Полученные с помощью нейрогистологических и гистохимических исследований,

электронной и конфокальной микроскопии данные свидетельствуют о высокой степени иннервации легких и многообразии в них различных нервных структур (нервных сплетений, нервных проводников, рецепторных аппаратов (механо- и хеморецепторов), ганглиев, параганглиев). Однако наибольшее число работ, посвященных изучению дыхательной системы, выполнено на половозрелых животных [3–8]. Менее изучено становление иннервации легких в эмбриональный и ранний постнатальный периоды [9–14]. Дискуссионным остается вопрос об этиологии и патогенезе заболеваний легких у новорожденных, мало изучено состояние нервных структур у недоношенных детей, недостаточно внимания уделяется становлению нейротканевых взаимоотношений на ранних сроках развития легких.

Цель настоящей работы состояла в иммуногистохимическом исследовании нервных аппаратов и мышечных структур легкого крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах Вистар ($n = 20$) в возрасте от одних до четырнадцати суток. Исследовались следующие сроки постнатального онтогенеза: одни сут (P1), пять сут (P5), семь сут (P7), десять сут (P10), четырнадцать сут (P14) по 4 животных на срок. Объектом исследования служил комплекс органов околосердечной области средостения, включающий в себя трахею, бронхи и легкие. Фиксацию исследуемых органов осуществляли в течение 24 ч в растворе цинк-этанол-формальдегида [15], обезживали в спиртах возрастающей крепости и ксилоле и заливали в парафин. Парафиновые срезы были сделаны с помощью ротационного микротомы Pfm Rotary 3003 (PFM, Германия). На срезах толщиной 5 мкм проводили иммуногистохимические (ИГХ) реакции для выявления нейтральных маркеров: тирозингидроксилазы (ТН) (для идентификации катехоламинергических структур), белка PGP 9.5, синаптофизина (Syn) — для синаптических структур. В работе использовали поликлональные кроличьи антитела к белку PGP 9.5 (Spring Bioscience, США); поликлональные кроличьи антитела к Syn (MONOSAN, Нидерланды); поликлональные кроличьи антитела в разведении к ТН (Abcam, Великобритания). Для выявления глии (шванновских клеток и леммоцитов) применяли кроличьи поликлональные антитела к белку S100 β (Dako, Дания). Для идентификации клеток мышечных тканей использовали поликлональные кроличьи антитела к саркомерному актину (Spring Bioscience, США). Первичные антитела в нужном разведении наносили на гистологические срезы после депарафинирования на одни сутки. В качестве вторичных ре-

агентов использовали реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (Spring Bioscience, США). Часть срезов окрашивали толудиновым синим и астровым синим. Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ срезов, выполненных через органо-комплекс грудной области новорожденных (P1) крыс на макроскопическом уровне, показал, что формирующиеся органы на этом раннем этапе онтогенеза достаточно иннервированы. На рисунке 1 представлена обзорная картина легочных структур, локализующихся в средостении.

На срезе хорошо видны профили нескольких органов: пищевода, дыхательной системы, полых и легочных вен, нервных стволов, ганглиев. Здесь же можно видеть участок перехода главного бронха в дольку легкого и его дихотомические деления на ветви второго, третьего и следующего порядков (рис. 1).

Сравнительный анализ серийных препаратов с ИГХ-реакциями на выявление PGP 9.5 и ТН показал наличие в нервных структурах трахеи и главных бронхах нервных элементов различной медиаторной природы. Как видно на рисунках, в трахее и в соседнем пищеводе преобладают холинергические структуры (рис. 2а, б). В изученных органах были выявлены лишь немногочисленные ТН⁺ стволы и пучки симпатических нервных волокон в сплетениях адвентиции и мышцах трахеи и немногочисленные группы располагающихся в ганглиях ТН⁺ хромаффинных клеток (ХК) (рис. 2б). Единичные ХК выявлялись иногда в альвеолярном отделе дольки. Обращает на себя внимание, что у новорожденных животных в пищеводе, в отличие от трахеи, расположенной рядом, практически не выявляются симпатические элементы (рис. 2б).

В раннем постнатальном онтогенезе особого внимания заслуживают широкопетлистые нервные сплетения, которые состоят из нервных стволов, мелких и крупных ганглиев, и расположены в интерстициальной соединительной ткани средостения, а также в адвентиции и мышцах трахеи и главного бронха (рис. 3а, б). Часть этого сплетения следует к воротам легкого и входит внутрь, в единственную, как известно, характерную для крыс, левую дольку.

В адвентиции трахеи и главных бронхов у крыс десятых сут постнатального развития P10 встречаются разных размеров нервные узлы (от 100 до 450 мкм), а в межмышечных слоях — микроганглии, состоящие из небольших групп PGP 9.5-им-

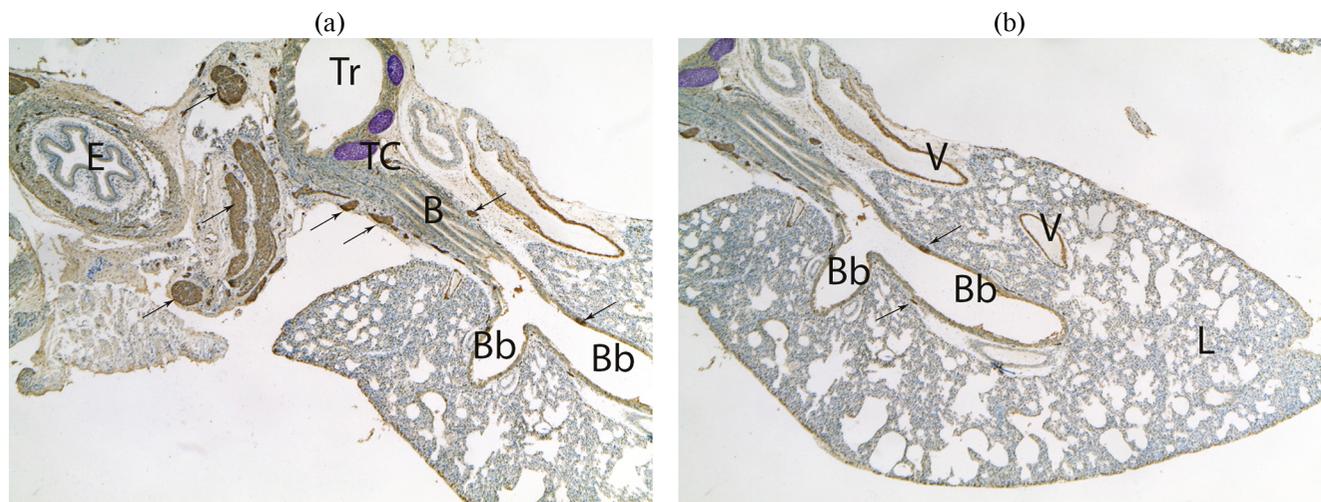


Рис. 1. Органно-тканевые структуры, локализующиеся в средостении (а), включая левую легочную долю (б) новорожденной крысы. Е — пищевод; L — легкое; Tr — трахея, В — главный бронх; Bb — ветви бронхов в доле; TC — хрящи трахеи; V — легочные вены; ↑↑ — нервные стволы, ганглии, пучки нервных сплетений. Иммуногистохимическая реакция на выявление белка RGP 9.5. Подкраска гематоксилином. Ув.: x40

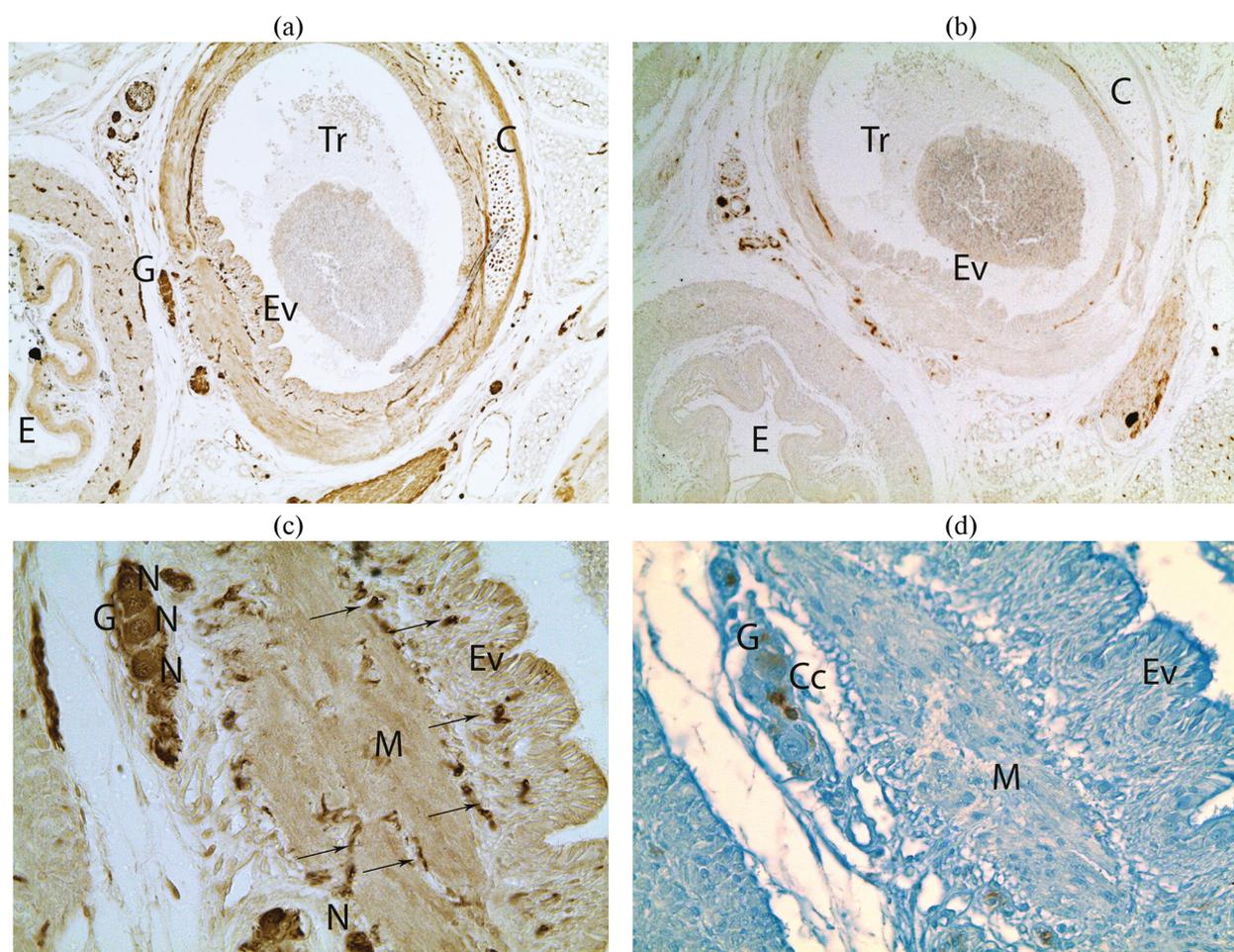


Рис. 2. Сравнительные картины поперечных срезов трахеи новорожденной крысы. Tr — трахея; C — хрящевая ткань; Ev — эпителиальные ворсинки слизистой между хрящевыми кольцами; M — гладкомышечные слои; G — ганглии; E — пищевод; Cc — хромоаффинные клетки, ↑↑ — синаптические терминальные варикозные аксоны в мышечной и слизистой пластинках трахеи; N — парасимпатические нейроны. Иммуногистохимические реакции на выявление белка RGP 9.5 (а, с) и тирозингидроксилазу (b, d). Ув.: x100(a, b); x400 (c, d).

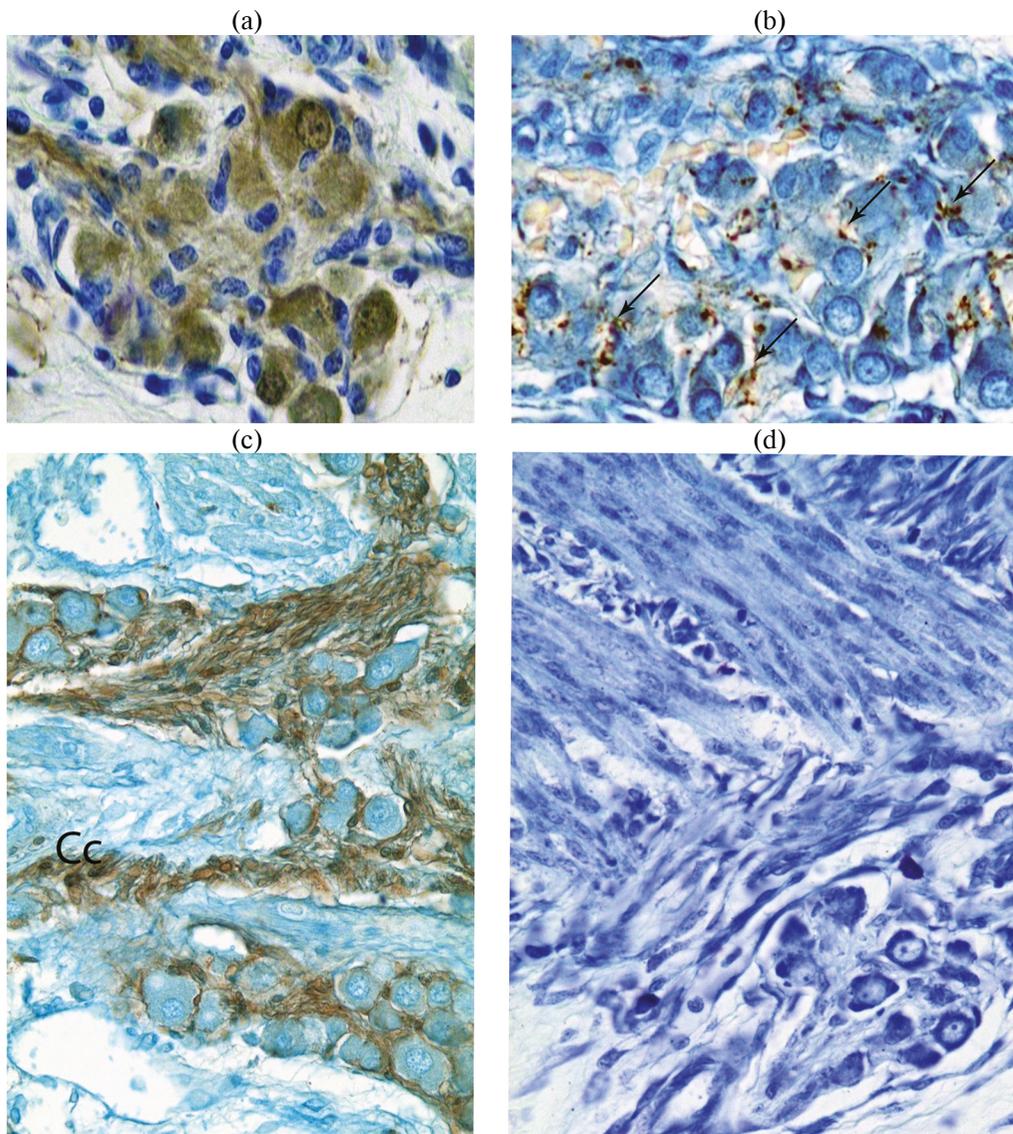


Рис. 3. Ганглии и микроганглии в средостении у крыс разного возраста: P7 (a, c), P1 (b), P10 (d). a, c — ганглии перибронхиального нервного сплетения крысы P7; b — синапсы преганглионарных волокон на развивающихся нейронах P1 (стрелки); d — молодые нейроны в мышечной оболочке крупного бронха крысы P10. ↑↑ — синаптические контакты; Cc — хромоафинные клетки. Иммуногистохимические реакции на выявление белка PGP 9.5(a), на синаптофизин (b), на тирозингидроксилазу (c). Докрашивание астровым синим (b, c) и толуидиновым синим (a, d). Ув.: x400.

муноположительных нейробластов, молодых нейронов и немногочисленных клеток-сателлитов (рис. 3). Дифференцирующиеся парасимпатические нейроны ганглиев трахеи имеют размеры приблизительно от 25 до 40 мкм, четко выраженные сферические ядра с ядрышком, развитую цитоплазму. Тела клеток и отростки избирательно окрашены на PGP 9.5 в темно-коричневый цвет, плотно прилегают друг к другу, и между ними встречаются лишь единичные клетки-сателлиты (рис. 3a). Неожиданным для нас стал факт обнаружения в симпатических ветвях симпатического нерва перибронхиальной области очаговых скоплений парасимпатических нейронов (рис. 3c). На рисунке можно видеть сплетение из пучков TH⁺ симпатических постганглионарных во-

локон, а между ними локализующиеся группы относительно крупных парасимпатических, иммунонегативных к TH, нейронов и отдельные ХК, селективно выявляющиеся этим методом на катехоламины.

Превалирование парасимпатических структур над симпатическими обнаружено нами также внутри дольки легкого.

Крупные нервные стволы и нервные узлы в дольке отсутствуют, они замещаются широкопетлистыми нервными сплетениями, состоящими из нервных пучков и микроганглиев. Плотность нервных структур снижается, и широкопетлистое сплетение переходит в “основное терминальное нервное сплетение”, состоящее из тяжей Ремака (варикозных аксонов) и сопровождающих их нейролеммоцитов. Эти

узкопетлистые сплетения, или сети, селективно выявляются с помощью ИГХ-реакций на PGP 9.5 и на синаптофизин, и, как известно, выполняют функции дистантных синапсов *en passant*. В дальнейшем мы их будем определять как синаптофизин-положительные нервные терминалы (СФПТ). Кроме дистантных синаптических окончаний на ранних сроках в ганглиях обнаружены и межнейронные синаптические структуры развивающихся перичеселлюлярных аппаратов. У новорожденных животных в некоторых ганглиях перибронхиальной области на телах и отростках нейробластов и молодых нейронов уже имеются СФ⁺ межнейронные синапсы, которые, по нашему мнению, образованы преганглионарными волокнами вагусного нерва (рис. 3b).

На микроскопическом уровне выявлена важная закономерность: ветви крупного и среднего калибра бронхов легкого интенсивно иннервированы. В их адвентиции локализуется перибронхиальное широкопетлистое сплетение из пучков проводниковых миелинизированных и немиелинизированных нервных волокон. Последние истончаются и переходят в узкопетлистые сети варикозных аксонов, которые представляют собой синаптические окончания на гладкомышечных клетках (ГМК) мускулатуры бронхов и сосудов адвентициальной оболочки. Таким образом, СФПТ участвуют в процессе сокращения мускулатуры бронхов.

Отмечен также ряд важных особенностей гистологического строения бронхо-сосудистых компонентов в развивающейся дольке. Выяснилось, что бронхи, артериальные и венозные сосуды крупного, среднего и мелкого калибра различаются не только тканевым строением, но и топографическим расположением в дольке. Как правило, сосуды и бронхи следуют строго параллельно друг другу и при этом артериальные и венозные сосуды находятся по разным сторонам от бронха. Это имеет значение не только для оценки кровоснабжения, дифференцировки бронхиального эпителия, мышечной и соединительной тканей бронхов и сосудов, но и для определения различий их иннервации на ранних стадиях развития.

В задачи исследования входило изучение не только нервных структур, но и особенностей строения и формирования мышечных элементов в развивающихся бронхах и легочных венах. Мы использовали также антитела к саркомерному актину, которые выявляют не только гладкомышечные клетки (ГМК), но и кардиомиоциты, характерные для стенки легочных вен.

С помощью ИГХ-реакций и окраски толуидиновым синим нами прослежены тесные взаимоотношения основного терминального синаптического нервного сплетения с клетками мышечной ткани стенки различного калибра бронхиальных ветвей.

При использовании специфических ИГХ-методов выявления синаптофизина, белка PGP 9.5 и саркомерного актина установлено, что ГМК мышц бронхов имеют направленную иннервацию, реализующуюся через СФПТ.

По мере дихотомического деления ветвей бронхиального дерева, артериальных и венозных сосудов наблюдается уменьшение их диаметров и плотности нервных структур. Эти параметры изменяются от трахеи и бронхов до респираторного альвеолярного отдела (рис. 4). Плотность и распределение нервных структур и, в частности, СФПТ нервных сплетений изменяется от центральных органов (трахея, главные бронхи) на разных уровнях дольки вплоть до дистальных отделов.

В пределах дольки нервные структуры локализуются также неравномерно. В бронхах большого и среднего калибра адвентициальной оболочке находятся широкопетлистые сплетения, состоящие из пучков проводниковых нервных волокон и микроганглиев. Пучки нервных волокон сплетения делятся, истончаются, и иннервация гладкомышечных клеток средней оболочки бронхов осуществляется тончайшими варикозными аксонами узкопетливой терминальной сети. СФПТ сети иннервируют не только слои гладкомышечной стенки средних и мелкого калибра бронхов, ГМК собственной пластинки слизистой оболочки, но и часть ГМК, располагающиеся субэпителиально.

Вокруг бронхов малого калибра и бронхиол наблюдаются слабо окрашенные рыхло расположенные тонкие нервные фрагменты терминальной сети варикозных аксонов (СФПТ). Незначительное количество терминалей варикозных аксонов встречается вокруг эпителия бронхиол, и практически, как видно на рисунке 5, они отсутствуют вокруг альвеол.

Внутри долек адвентициальная соединительная ткань и слои гладкой мышечной ткани заметно истончаются в период от P1 до P7–P14, в зависимости от калибра бронхов постепенно изменяется плотность мышечной оболочки и СФПТ. И наконец, вокруг бронхиального однорядного кубического эпителия встречаются только отдельные иммунореактивные тяжи Ремака, состоящие из тончайших терминалей варикозных аксонов. В стенках альвеолярных мешочков, альвеол и капилляров наблюдаются диффузно располагающиеся гладкомышечные элементы (рис. 6b, e). Можно предположить, что эти клетки выполняют функцию специализированных элементов, сходных с так называемыми “эпителиально-мышечные клетками” железистой ткани.

Оказалось, что в стенках большинства венозных кровеносных сосудов нервные аппараты на данных стадиях развития еще не выявляются (рис. 4c). В то же время в нескольких случаях удалось встретить

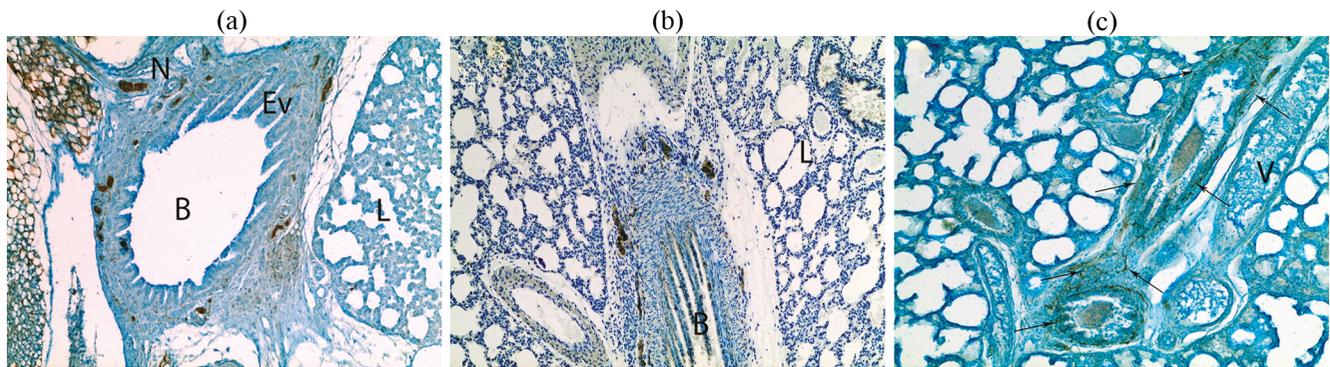


Рис. 4. Ганглиозные нервные сплетения вокруг бронхов разного калибра в дольке левого легкого крысы P7 (a) и P10 (b, c). L — долька легкого; B — главный бронх; Ev — ворсинки слизистого эпителия бронха; N — нервная клетка; V — венозный сосуд; ↑↑ — синатнофизин-иммунопозитивные терминалы (СФПТ). Иммуногистохимическая реакция на выявление белка PGP 9.5 (a), тирозингидроксилазу (b) и синаптофизин (c). Докрашивание толуидиновым синим (a, b) и астровым синим (c). Ув.: $\times 100$.

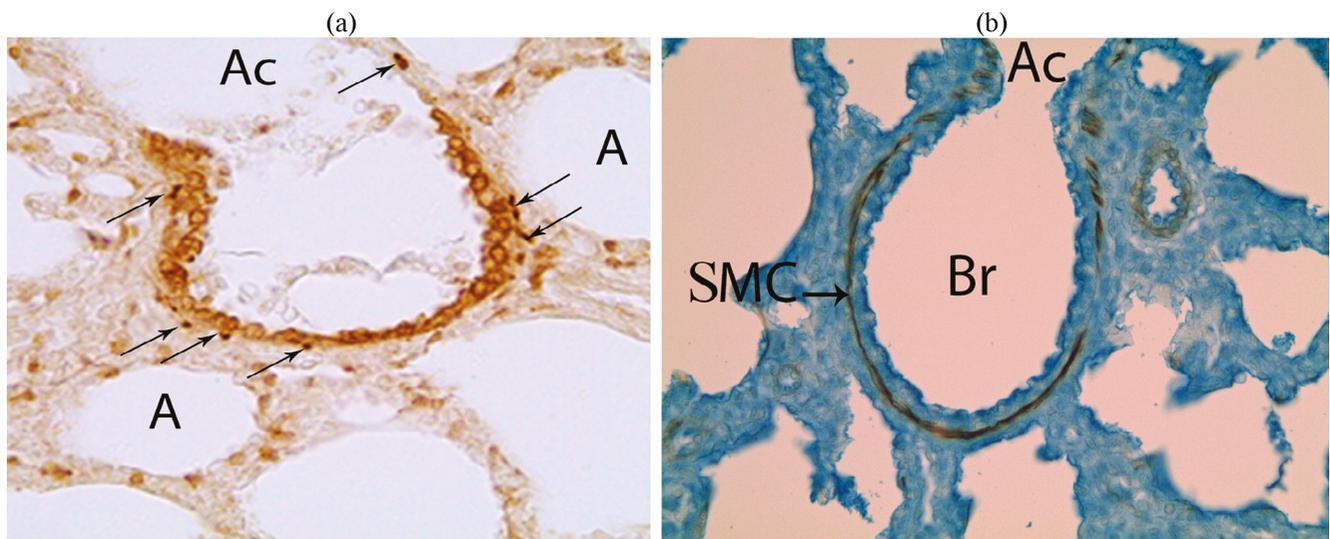


Рис. 5. Участки перехода кубического бронхиального эпителия в плоский альвеолярный у крыс P5-7. A — альвеола; Ac — ацинарный легочный мешочек; SMC — гладкомышечные клетки; Br — бронхиола; ↑↑ — нервные терминалы. Иммуногистохимические реакции на выявление белка PGP 9.5 (a) и на актин саркомерный (b). Докрашивание астровым синим (b). Ув.: $\times 400$.

мышечные сфинктеры вокруг эндотелия легочных венозных сосудов, наподобие муфт, состоящих из скоплений упорядоченно расположенных, специализированных гипертрофированных и высоко иммунореактивных ГМК (рис. 6e).

С помощью маркера к саркомерному актину выяснилось, что на изученных стадиях развития ГМК многих крупных и средних ветвей бронхов и некоторых сосудов уже достаточно хорошо дифференцированы. На рисунке для сравнения показаны окрашенные в черно-коричневые тона клеточные элементы двух типов мышечной ткани (6c, d). В стенках развивающихся легочных вен, расположенных в средостении и в краниальных отделах дольки, выявляются различной толщины пучки из поперечно-исчерченных кардиомиоцитов, сходных с клетками миокарда. Стенка венозных сосудов малого калибра (15–25 мкм), локализирующихся в дистальной

части дольки (рис. 6d), представлена только одним слоем кардиомиоцитов, в то время как в легочных венах средостения, впадающих в левое предсердие и доставляющих обогащенную кислородом кровь в сердце, толщина стенки из кардиомиоцитов достигает большей толщины (30–50 мкм).

При исследовании иннервации структур воздухоносных путей было обращено внимание не только на нервные аппараты, но и на глиальные элементы. С помощью применения глиального маркера белка S100 β установлено, что на исследованных сроках развития легкого в ганглиях в нервных стволах и различного вида сплетениях присутствует достаточно большое число разновидностей глии АНС: шванновских клеток и нейролеммоцитов миелинизированных и немиелинизированных постганглионарных нервных волокон и клеток-сателлитов. Любопытно отметить, что кроме харак-

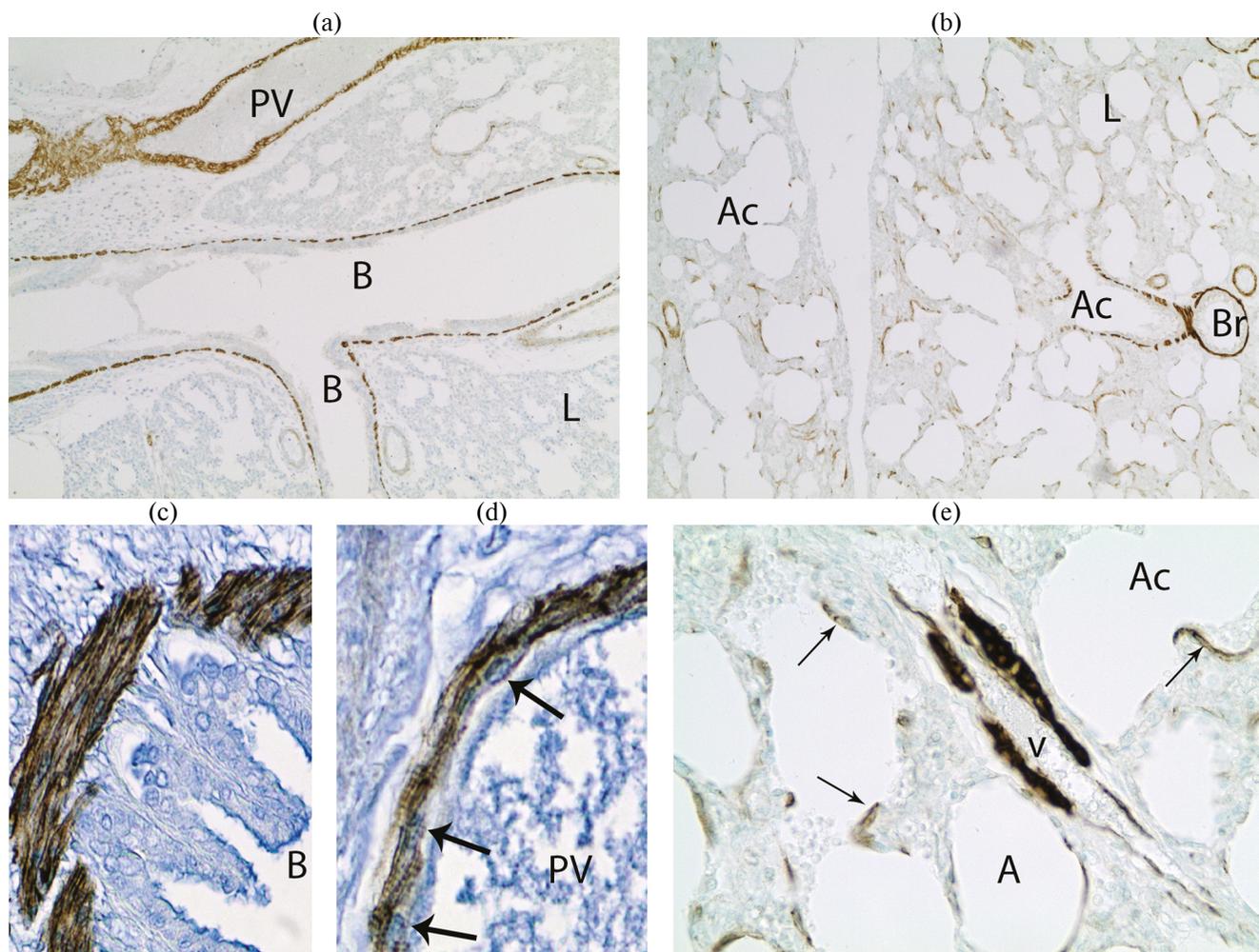


Рис. 6. Различные типы клеток мышечной ткани в стенках бронхов и легочной вены: (а) — мышечные клетки в дольке легкого крысы P1; (б) — диффузно расположенные ГМК в альвеолярном отделе крысы P7; (с) — пучки ГМК в стенке бронха; (д) — слой кардиомиоцитов в стенке легочной вены (PV) на P1; (е) — сфинктер (“муфта”) из гипертрофированных гладкомышечных клеток в альвеолярном отделе легкого крысы P7. V — венный сосуд; A — альвеола; Ac — ацинарный легочный мешочек; тонкие стрелки — диффузно расположенные ГМК; толстые стрелки — ядра кардиомиоцитов; B — бронх; Br — бронхиола; L — альвеолярный отдел легкого. Иммуногистохимическая реакция на выявление актина саркомерного. Ув.: x100 (a, b); x400 (c, d, e).

терных для АНС глиальных клеток в альвеолярном отделе дольки с помощью ИГХ-реакции нами обнаружена еще одна разновидность глиальных элементов. S100 β -иммуноположительные клетки размерами 9–15 мкм имеют округлые ядра и относительно большой объем цитоплазмы, снабжены цитоплазматическими отростками (рис. 7). Они располагаются в межальвеолярных септах, у многих из них цитоплазматические отростки прослеживаются на значительном протяжении в интерстиции. На рисунке 7а можно видеть, что отростки S100 β ⁺ клеток находятся в очень близком контакте с телами соседних клеточных элементов. По морфологическим и иммуноцитохимическим признакам эти клетки представляют собой, вероятнее всего, местные специализированные глиальные элементы автономной нервной системы, сходные с интерстициальными элементами Кахала. Следует отметить,

что осевые цилиндры аксонов в их цитоплазме не выявляются или отсутствуют.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования морфологических особенностей легких у лабораторных животных и человека в пренатальном онтогенезе проводились как в прошлом, так и в позапрошлом столетиях и продолжают в настоящее время. Они касаются изучения источников происхождения тканей легких из различных зародышевых листков, дифференцировки эпителия бронхов, гладкомышечных клеток дыхательных путей, а также вопросов иннервации тканей легкого [6–8, 10, 12]. Нейрогистологические, электронно-микроскопические и ИГХ-исследования 80–90-ых годов XX века были посвящены описанию не только нервных аппаратов (ганглиев, нерв-

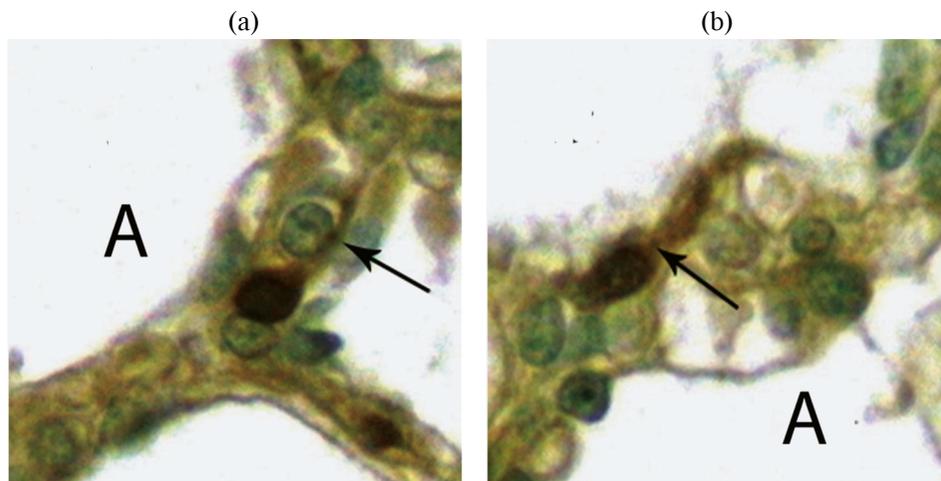


Рис. 7. Фрагменты легкого новорожденной крысы (a, b). А — альвеолы. ↑↑ — тела и отростки $S100\beta^+$ глиоцитов в межальвеолярных септах. Иммуногистохимическая реакция на выявление белка $S100\beta$. Ув.: $\times 400$.

ных сплетений, нервных волокон и рецепторных и эфферентных нервных окончаний), но и иннервации кровеносных сосудов бронхиального дерева [16, 17]. Были выявлены регуляторные белки, определена медиаторная природа многих из них: CGRP, ТН, нейропептид Y, вазоактивный интестинальный полипептид, холецистокинин, соматостатин и др. [16]. С применением ИГХ-методов показано, что у свиньи и у человека нервные структуры дыхательных путей формируются в пренатальный период развития [9, 10, 13]. Используя физиологические методы исследования, установлено, что в ответ на нервную стимуляцию интрамуральных ганглиев бронхи легкого в ранний период уже могут отвечать сокращением клеток мускулатуры [18]. Настоящее исследование является продолжением наших работ, выполненных ранее на легких половозрелых крыс [6–8]. С помощью применения ИГХ-маркеров ранее отмечалось, что нервные аппараты воздухоносных путей половозрелых животных иннервируются не только парасимпатическими, но и симпатическими постганглионарными нервными элементами [18]. Среди них присутствуют микроганглии и отдельные нейроны, синаптические терминальные сети из афферентных и эфферентных парасимпатических нервных волокон, а также нейроэпителиальные тельца. Значительно реже встречаются симпатические постганглионарные волокна, локализующиеся вокруг сосудов. Показана богатая иннервация мышечной и лимфоидной тканей бронхов и кровеносных сосудов долек [8, 17, 19].

В настоящей работе благодаря применению ИГХ-методов исследования (реакций на ТН и белок PGP 9.5) установлено, что в ранний постнатальный период у крыс плотность холинергических нервных структур бронхиального дерева преобладает над катехоламинергическими. Ранее Блинова и др. (2021) [19], применив гистохимические ме-

тоды выявления симпатических и парасимпатических структур на замороженных срезах легких кролика на разных сроках постнатального онтогенеза, показали усложнение развития вегетативной иннервации легких кроликов. По мнению авторов, происходит увеличение числа пучков адренергических и холинергических волокон в дистальном направлении как в бронхах, так и в сосудах. В отличие от цитируемых авторов, результаты настоящего исследования показали, что в легких крыс с возрастом снижается симпатическая иннервация по сравнению с парасимпатической.

Интересно отметить, что в отличие от миокарда, гладкой мускулатуры тонкого и толстого кишечника, стенок коронарных сосудов, иннервация которых возрастает к половозрелому возрасту животных [8], в легких наблюдается снижение иннервации в кранио-каудальном направлении. Ранее и другими авторами отмечалась общая неравномерность распределения нервных структур в мышечной ткани легких взрослых животных: снижение иннервации в кранио-каудальном направлении от трахеи к долькам. В настоящей работе это прослежено в развивающихся легких.

В связи с этим мы обратили внимание на глиальные элементы в развивающемся легком. О роли нейроглиальных клеток в физиологии и патофизиологии легких малоизвестно [20]. Недавно были раскрыты некоторые клеточные и молекулярные механизмы того, как шванновские клетки как основные компоненты ПНС и АНС могут регулировать выживаемость, распространение и инвазивность опухолевых клеток в легких *in vitro* и *in vivo* [20]. Показано, что шванновские клетки контролируют формирование и поддержание микросреды рака легких и поддерживают образование метастазов. По мнению авторов, от количества

шванновских клеток в легких может зависеть выживаемость пациентов.

Кроме известных глиальных клеточных элементов (шванновских клеток и/или нейролеммоцитов) миелинизированных и немиелинизированных нервных волокон и клеток-сателлитов интрамуральных ганглиев в настоящей работе в раннем онтогенезе у крыс выявлена еще одна разновидность глии. $S100\beta^+$ клетки локализуются в интерстициальных септах транспираторных или альвеолярных отделах легкого и по морфологическим признакам сходны с малодифференцированными глиальными элементами — леммообластами, нейролеммоцитами без миелиновых нервных волокон и с так называемыми интерстициальными клетками Кахаля, описанными на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях в энтеральной нервной системе [21]. Предположительно клетки Кахаля участвуют в иннервации гладкой мышечной ткани стенок кишечного тракта, кровеносных сосудов, мочевого пузыря и др. [22–26]. С применением электронной микроскопии описаны их тесные взаимоотношения с фибробластами, гладкомышечными и эндотелиальными клетками. Имеются данные о том, что интерстициальные клетки Кахаля выполняют роль пейсмекров для функции запуска и проведения низкочастотных сокращений гладкой мышечной ткани [24]. Известно также, что они окружают или тесно прилегают к тлям и пакетам тончайших варикозных аксонов [24, 26]. Согласно имеющимся данным литературы и наших собственных многолетних наблюдений, можно сделать предположение о наличии тесных контактов этих клеток с терминалями постганглионарных безмиелиновых нервных волокон различной медиаторной природы [22–24].

В настоящей работе показано, что в альвеолярных отделах развивающегося легкого отсутствуют нервные структуры, что подтверждается негативными реакциями на белок PGP 9.5, синаптофизин и тирозингидроксилазу. Учитывая отсутствие иннервации в септах и ацинусах долек легких, можно предположить, что обнаруженные нами $S100\beta^+$ клетки оказывают влияние на эпителиальные элементы (альвеолоциты I и II типов), а также на специализированные гладкомышечные (и/или эпителиально-мышечные) клетки альвеол, вырабатывая регуляторные нейротрофические факторы.

Формирование гладкомышечной ткани и ее взаимоотношение с нервными структурами было прослежено на протяжении трех периодов (псевдоганглиулярной, каналикулярной и саккулярной) развития легкого свиньи [12]. С использованием конфокальной микроскопии было показано, как от ганглиев отходят пучки нервных волокон, образующие сплетения, которые окружают “ветви” бронхиального дерева и следуют вплоть до “зоны роста”

долек [12]. В настоящем исследовании мы использовали антитела к саркомерному актину, которые позволяют выявлять как гладкомышечные клетки, так и кардиомиоциты. С помощью нейроиммуногистохимических реакций нам удалось проследить иннервацию гладкомышечных клеток с нервными структурами и тесные взаимоотношения между ними основного терминального синаптического нервного сплетения с клетками мышечной ткани стенки различного калибра бронхиальных ветвей в дольках в ранний период постнатального развития. Отростки нервных клеток ганглиев, расположенных в адвентиции трахеи, главных бронхов, а также микроганглиев вокруг бронхиальных веточек внутри долек образуют дистантные синаптические связи с ГМК и участвуют в иннервации ее тканей на ранних сроках постнатального периода. Следует отметить, что по сравнению с бронхами, кровеносные сосуды микроциркуляторного русла в легких крыс в исследованные сроки постнатального развития практически не иннервированы.

Особого внимания заслуживают данные о морфофункциональных особенностях строения мышечной оболочки легочных вен у крыс раннего постнатального развития. Как известно, легочные вены выполняют одну из важнейших функций выведения и доставки к сердцу обогащенной кислородом крови. Кроме того, следует учитывать морфологические особенности строения стенок этих сосудов [6, 7]. В настоящей работе установлено, что мышечная оболочка стенки легочных вен новорожденных животных уже состоят из двух типов мышечной ткани (гладкомышечной и поперечно-исчерченной).

Изменение и нарушение вегетативной иннервации этих сосудов могут иметь большое значение при патологии легких. Например, это отмечается в исследованиях механизмов формирования сердечно-легочных аритмий и легочной гипертензии различного происхождения [27, 28]. Показано участие автономной нервной системы в процессе ремоделирования сосудов малого круга кровообращения при патологии различного генеза [27, 28].

Исследование развития межтканевых взаимоотношений в легком показало, что в ранний период постнатального развития имеет место не только синаптогенез в ганглиях, но и устанавливаются межнейронные дистантные синаптические взаимоотношения между ГМК и преганглионарными нервными волокнами вагусного нерва. На основании этих фактов мы предполагаем, что существенными механизмами начала регулируемой иннервации воздухоносных путей служит синхронизация последовательности межнейронных рефлексивных по оси (ЦНС/АНС) и нейро-мышечных синаптических связей

(АНС/ГМК), а также нормальный ход процессов нейро- и миогенеза в пре- и постнатальном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе благодаря применению ИГХ-методов исследования нервные аппараты выявлены вокруг трахеи, главных бронхов, корня аорты в области средостения и ворот легких. Обнаружено превалирование парасимпатических структур над симпатическими в кранио-каудальном направлении левой доли легкого. Получены морфологические данные о тесных взаимоотношениях основного терминального синаптического сплетения с гладкомышечными клетками мышечной оболочки бронхиальных ветвей, синхронное установление межнейронных и нейромышечных синапсов. Наличие иннервации гладкомышечной ткани воздухоносных путей прослежено в данной работе до бронхиол и альвеолярных ацинусов. Все это свидетельствует о начале развития направленной регуляции дыхательных функций у новорожденных животных. Показано практически полное отсутствие нервных структур и признаков иннервации ГМК в альвеолярных отделах легкого. В этом отделе нами впервые обнаружены $S100\beta^+$ глиоциты, сходные с клетками Кахала. Важно подчеркнуть, что на ранних сроках развития в изученных отделах дыхательной системы отсутствует свойственная половозрелым животным бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань и слаба развита иннервация сосудов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Разработка концепции, анализ данных, написание (Е.И.Ч., Е.С.П.) и редактирование манускрипта (Д.Э.К.)

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” (1/25 от 30.01.2025 г.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”. Шифр темы: GFWG-2025-0003. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошечая ЕГ, Данилова ИА, Сидорин ВС, Моисеева ОМ, Митрофанова ЛБ (2022) Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков экстрацеллюлярного матрикса и иннервации легких у пациентов с легочной артериальной гипертензией. Артер гипертенз 28(2): 198–210. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2022-28-2-198-210>
2. Имнадзе ГГ, Серов РА, Ревизивили АШ (2004) Морфология легочных вен и их мышечных муфт, роль в возникновении фибрилляции предсердий. Вестн Аритмологии 34: 44–49.
3. Mortola JP, Marghescu D, Siegrist-Johnstone R, Matthes E (2020) Respiratory sinus arrhythmia during a mental attention task: the role of breathing-specific heart rate. Respirat Physiol Neurobiol 272: 103331. <https://doi.org/10.1016/J.Resp.2019.103331>
4. Филиппова ЛВ, Ноздрачев АД (2013) Сенсорные структуры легких и воздухоносных путей. Усп. Физиол. наук 44 (3): 93–112.
5. Шемяков СЕ, Федосов АА (2024) Анатомия и гистология легких / В кн.: Респираторная медицина: руководство: в 4 т. / под ред. А. Г. Чучалина. — 3-е изд., доп. и перераб. — Москва: ПульмоМедиа 1: 18–47.
6. Чумасов ЕИ, Ворончихин ПА, Коржевский ДЭ (2011) Иннервация сердечной поперечнополосатой мышечной ткани легочных вен крысы. Морфология 140(6): 53–55.
7. Чумасов ЕИ, Ворончихин ПА, Коржевский ДЭ (2012) Эфферентная иннервация сосудов и бронхов легкого крысы (иммуногистохимическое исследование). Морфология 142(4): 49–53.
8. Чумасов ЕИ, Колос ЕА, Петрова ЕС, Коржевский ДЭ (2020) Иммуногистохимия периферической нервной системы. СПб.: СпецЛит.
9. Weichselbaum M, Sparrow MP (1999) A confocal microscopic study of the formation of ganglia in the airways of fetal pig lung. Am J Respir Cell Mol Biol 21(5): 607–620. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.5.3721>
10. Sparrow MP, Weichselbaum M, McCray PB (1999) Development of the innervations and airway smooth muscle in human fetal lung. Am J Respir Cell Mol Biol 21(5): 607–620.
11. Целуйко СС, Гордиенко ЕН, Колесников СИ (2014) Сравнительный морфометрический анализ паренхимы легкого крыс на этапе позднего эмбриогенеза. Дальневосточн. Мед. Журн. 2: 71–75.
12. Schittny JC (2017) Development of the lung. Cell Tissue Res 367(3): 427–444. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2545-0>
13. Haley KJ, Drazen JM, Osathanondh R, Sunday ME (1997) Comparison of the ontogeny of protein gene product 9.5, chromogaphin A and proliferating cell nuclear antigen in developing human lung. Microsc Res Tech 37: 62–68.
14. Sparrow MP, Lamb JP (2003) Ontogeny of airway smooth muscle: structure, innervation, myogenesis and function in the fetal lung. Respirat Physiol Neurobiol 137(2-3): 361–372. [https://doi.org/10.1016/s1569-9048\(03\)00159-9](https://doi.org/10.1016/s1569-9048(03)00159-9)
15. Grigorev IP, Korzhevskii DE (2018) Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). Modern Technol Med 10(2): 156–165. <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>

16. Polak JM, Bloom SR (2004) Regulatory peptides and neuron-specific enolase in the respiratory tract of man and other mammals. *Exp Lung Res* 1982 3(3–4): 313–328. <https://doi.org/10.3109/01902148209069660>
17. Cavallotti C, Tonnarini GF, Tranquilli Leali FM (2004) Cholinergic innervation of BALT (bronchus associated lymphoid tissue) in rat. *Lung* 182(1): 27–35. <https://doi.org/10.1007/s00408-003-1042-x>
18. Sparrow MP, Warwick SP, Everett AW (1995) Innervation and function of the distal airways in the developing bronchial tree of fetal pig lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(5): 518–525. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.13.5.7576686>
19. Блинова СА, Юлдашева НБ, Хотамова ГБ (2021) Вегетативная иннервация легких в постнатальном онтогенезе. *Вопр. науч образ.* 19 (144): 52–57.
20. Shurin MR, Wheeler SE, Shurin GV, Zhong H, Zhou Y (2024) Schwann cells in the normal and pathological lung microenvironment. *Front Mol Biosci* 11:1365760. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1365760>
21. Rumessen JJ, Mikkelsen HB, Qvortrup K, Thuneberg L (1993) Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in circular muscle of human small intestine. *Gastroenterology* 104 (2): 343–350.
22. Лаврентьев БИ (1983) Теория строения вегетативной нервной системы. М.: Медицина.
23. Gabella G (2022) Enteric glia: Extent, cohesion, axonal contacts, membrane separations and mitochondria in Auerbach's ganglia of guinea pigs. *Cell Tissue Res* 389(3): 409–426. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03656-3>
24. Rumessen JJ, Vanderwinden JM, Horn T (2010) Ulcerative colitis: ultrastructure of interstitial cells in myenteric plexus. *Ultrastruct Pathol.* 34(5): 279–287. <https://doi.org/10.3109/01913121003770701>
25. Furness JB, Stebbing MJ (2018) The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterol Motil* 30(2). <https://doi.org/10.1111/nmo.13234>
26. Sander KM, Ward SM, Koh SD (2014) Interstitial cells: Regulations of smooth muscle function. *Physiol Rev* 94: 859–907.
27. Артюхина ЕА, Кузнецов НМ, Васковский ВА, Яшков МВ, Дедух ЕВ, Таймасова ИА, Ревшивили АШ (2023) Сравнение эффективности криобаллонной и комбинированной методик изоляции легочных вен у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий: интраоперационные и госпитальные результаты. *Диагностич. Интервенцион. Радиол.* 17(1): 25–33.
28. Шиленко ЛА, Чепурной ЗИ, Маматов МВ, Воротилов АВ, Мухина АА, Шиленко А А., Ваулина ДД, Смирнов СС, Карпов АА (2022) Иннервация сосудов малого круга кровообращения в норме и при легочной гипертензии. *Универс. Тер. Вестн.* 3(4): 40–52.

STRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL FEATURES OF THE PROCESS OF FORMATION OF INNERVATION OF THE AIRWAYS AND LUNGS OF THE RAT

E. I. Chumasov^{a, b, #}, E. S. Petrova^a, D. E. Korzhevskii^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia*

^b*St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: ua1ct@mail.ru*

The aim of the work is to study the development of the nervous apparatus and muscle structures of the rat lung in the early stages of postnatal development. The objects of study were extramural and intramural parts of the lung (trachea, main bronchi and lobar parts of the lung, including the respiratory section) of Wistar rats aged from one to fourteen days. Nervous structures were studied using immunohistochemical markers: PGP 9.5 protein, tyrosine hydroxylase, synaptophysin. Sarcomeric actin was used to identify muscle cells. It was found that in newborn rats, the distribution density of cholinergic structures (parasympathetic ganglia, microganglia of the nerve plexuses and terminal synaptic networks) prevails over catecholaminergic (sympathetic neurons and bundles of postganglionic fibers). Ganglionic plexuses are located around the trachea and main bronchi. Changes in tissue innervation in the bronchial wall of the lung in the cranio-caudal direction were detected. High density of distribution of nerve plexuses is characteristic of the proximal sections. They are absent in the alveolar regions. Close relationships of the main terminal nerve plexus with muscle tissue cells of the bronchial wall of different calibers up to the bronchioles are shown. Low innervation of cellular elements in the lobules around the pulmonary sacs and the absence of nerve terminals in the interalveolar septa are noted. Using the reaction to the S100 β protein, cellular elements morphologically similar to the glial cells of Cajal, without axons included in their cytoplasm, were revealed in these places. An important feature is noted: the presence of cardiomyocytes in the muscular wall of the main pulmonary veins of the mediastinum and the cranial section of the lung. In the alveolar parts of the lungs, the wall of the pulmonary vein consists of smooth myocytes and the sphincters formed by them. The issues of differences in the histological structure and innervation of the afferent, efferent and exchange arterial and venous vessels of the microcirculatory bed of the lung require further special study. The absence of broncho-associated lymphoid tissue, characteristic of sexually mature animals, in the studied material at early stages of development was noted. The synchronicity of the formation of interneuronal and neuromuscular synapses, which are important for regulating the onset of the respiratory process in animals, was established.

Keywords: rat lungs, trachea and bronchi, nerve structures, PGP 9.5 protein, synaptophysin, tyrosine hydroxylase, actin, ontogenesis, immunohistochemistry