



Иммуногистохимическое исследование симпатической иннервации толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре*

Чумасов Е. И.¹, Майстренко Н. А.², Ромашенко П. Н.², Самедов В. Б.², Петрова Е. С.¹, Коржевский Д. Э.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, Россия

² Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, Россия

Для цитирования: Чумасов Е. И., Майстренко Н. А., Ромашенко П. Н., Самедов В. Б., Петрова Е. С., Коржевский Д. Э. Иммуногистохимическое исследование симпатической иннервации толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;207(11): 191–197. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-191-197

✉ **Для переписки:**
Чумасов Евгений Иванович
 ua1ct@mail.ru
Чумасов Евгений Иванович, профессор, д.б.н., профессор, старший научный сотрудник Отдела общей и частной морфологии
Майстренко Николай Анатольевич, академик РАН, д.м.н., профессор, профессор кафедры факультетской хирургии им. С. П. Федорова
Ромашенко Павел Николаевич, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, начальник кафедры факультетской хирургии им. С. П. Федорова
Самедов Вадим Бейбалаевич, адъюнкт при кафедре факультетской хирургии им. С. П. Федорова
Петрова Елена Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Отдела общей и частной морфологии
Коржевский Дмитрий Эдуардович, профессор РАН, д.м.н., заведующий Лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии

Резюме

* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал (стр. VII–X).

Цель настоящего исследования — выяснить распределение и особенности симпатической иннервации тканей стенки кишки человека при ХМТЗ с помощью иммуногистохимических методов.

Материалы и методы. Иммуногистохимическое исследование сегментов кишечника (ободочной и сигмовидной кишки), полученных в результате хирургического лечения больных тяжелой формой хронического медленно-транзитного запора (ХМТЗ) проводилось с использованием нейтральных маркеров (белка PGP 9.5, тирозингидроксилазы, синаптофизина).

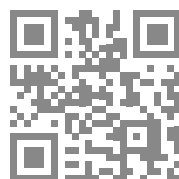
Результаты. Выяснилось, что основная масса постганглионарных симпатических нервных волокон локализуется в Ауэрбаховом и Мейснеровом сплетениях. Их терминальные аксоны образуют вокруг холинергических нейронов перичеселлярные синаптические аппараты. Другая часть симпатических волокон участвует в иннервации мышечной пластинки слизистой оболочки и стенки венозных сосудов подслизистой оболочки; их терминальные варикозные аксоны закачиваются на гладкомышечных клетках дистантными синапсами *en passant*. Установлены существенные особенности нарушения симпатической иннервации толстого кишечника исследованных больных; обнаружены морфологические признаки реактивных, дистрофических и тяжелых дегенеративных изменений симпатических аппаратов в ганглиозных сплетениях. Выявлены закономерности отсутствия симпатической иннервации в двух основных мышечных слоях (продольном и циркулярном), а также в слизистой оболочке. В изученных отделах толстого кишечника симпатические нейроны не обнаружены.

Заключение. Предполагается, что выявленные патологические изменения симпатической иннервации при ХМТЗ могут служить одной из основных причин нарушения нормальных функций кишечника.

Ключевые слова: ободочная кишка человека, сигмовидная кишка человека, ХМТЗ, тирозингидроксилаза, белок PGP 9.5, иммуногистохимия

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: PXTDXG



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-207-11-191-197>

Immunohistochemical study of the sympathetic innervation of the colon in chronic slow-transit constipation*

E. I. Chumasov¹, N. A. Maistrenko², P. N. Romashchenko², V. B. Samedov², E. S. Petrova¹, D. E. Korzhevskii¹

¹ Institute of Experimental Medicine, 12, Akademika Pavlova str., 197022, St. Petersburg, Russian Federation

² S. M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 6, Akademika Lebedeva str., 194004, St. Petersburg, Russian Federation

For citation: Chumasov E. I., Maistrenko N. A., Romashchenko P. N., Samedov V. B., Petrova E. S., Korzhevskii D. E. Immunohistochemical study of the sympathetic innervation of the colon in chronic slow-transit constipation. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;207(11): 191–197. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-191-197

✉ **Corresponding author:**

Evgenii I. Chumasov

ua1ct@mail.ru

Evgenii I. Chumasov, Professor, Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher of the Department of General and Private Morphology; ORCID: 0000-0003-4859-6766, Research ID: C2255-2012, Scopus ID: 7006721424

Nicolay A. Maistrenko, Doctor of Medical Sciences, professor, academic of RAS, professor of the S. P. Fedorov Department and Clinic of Faculty Surgery; ORCID: 0000-0002-1405-7660

Pavel N. Romashchenko, Doctor of Medical Sciences, professor, corresponding member of RAS, head of the S. P. Fedorov Department and Clinic of Faculty Surgery; ORCID: 0000-0002-1405-7660

Vadim B. Samedov, Associate Professor at the Department of Faculty Surgery named after S. P. Fedorov; ORCID: 0000-0002-4002-6913

Elena S. Petrova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Department of General and Private Morphology; ORCID: 0000-0003-0972-8658, Research ID: B-5498-2012, Scopus ID: 7103035013

Dmitry E. Korzhevskii, Professor of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System of the Department of General and Private Morphology; ORCID: 0000-0002-2456-8165, Research ID: C2206-2012

Summary

The purpose of this study is to determine the distribution and features of sympathetic innervation of the tissues of the human colon wall in chronic slow-transit constipation using immunohistochemical methods.

Materials and methods. Immunohistochemical study of large intestine segments (colon and sigmoid colon) obtained as a result of surgical treatment of patients with chronic slow-transit constipation was carried out using neural markers (PGP 9.5 protein, tyrosine hydroxylase, synaptophysin).

Results. It has been shown that the majority of postganglionic sympathetic nerve fibers are localized in the Auerbach and Meissner plexuses. Their terminal axons form pericellular synaptic apparatuses around cholinergic neurons. Another part of the sympathetic fibers is involved in the innervation of the muscular plate of the mucous membrane and the walls of the venous vessels of the submucosa; their terminal varicose axons can be seen on smooth muscle cells as distant synapses en passant. Significant features of sympathetic innervation disorders of the large intestine of the studied patients were established; morphological evidence for the reactive, dystrophic and degenerative changes in the sympathetic apparatuses in the ganglionic plexuses were found. The regularities of the absence of sympathetic innervation in two muscle layers (longitudinal and circular), as well as in the mucous membrane, were revealed. Sympathetic neurons were not found in the studied sections of the large intestine.

Conclusion. It is assumed that the identified pathological changes in sympathetic innervation in chronic slow-transit constipation can serve as one of the main causes of disruption of normal bowel functions.

* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal (p. VII–X).

Keywords: human colon, human sigmoid colon, chronic slow-transit constipation, tyrosine hydroxylase, PGP 9.5 protein, immunohistochemistry

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Иннервация стенки толстой кишки (ТКШ) осуществляется нейронами парасимпатического и симпатического отделов автономной нервной системы. Часть парасимпатических волокон приходит из высших центров нервной системы – бульбарного отдела мозга, от нейронов чревного и подчревных ганглиев, от нейронов тазового сплетения, а также от нейронов спинномозговых ганглиев [1–3]. На основании электрофизиологических, морфологических, биохимических и фармакологических исследований в энтеральной нервной системе (ЭНС) выделяют более десяти различных типов ганглиозных нейронов, количество которых составляет по некоторым данным более 150 млн [4]. Установлено, что подавляющее количество нейронов, нервных волокон, ганглиев и сплетений ЭНС толстого кишечника являются холинергическими. В отношении симпатической иннервации вопрос остается открытым. Считается, что источником симпатической иннервации стенки толстой кишки являются симпатические нейроны пара- и превертебральных ганглиев, которые экспрессируют катехоламины (адреналин, норадреналин и дофамин, но главным образом, норадреналин) [1, 2, 5, 6]. Многие вопросы морфологии, функции и распределения симпатических структур в тканях ТКШ менее изучены по сравнению с парасимпатическим отделом ЖКТ. Это важно иметь в виду в связи с тем, что симпатические нервные волокна наряду с парасимпатическими, обеспечивают помимо моторной и много других важных функций (поддержание нейротрофики, тканевой дифференцировки, обмена веществ). Нет окончательного ответа о наличии собственных симпатических нейронов в ТКШ человека и животных.

Энтеральная или метасимпатическая нервная система, по мнению академика А. Н. Ноздрачёва (1983) [1], отличается от парасимпатического и симпатического отделов АНС рядом существенных морфологических, физиологических, гистохимических и биохимических признаков. Для нее характерно ультраструктурное сходство с ЦНС [1,2,6,7]. По медиаторному статусу и набору регуляторных

пептидов (нейротрансмиттеров) ЭНС, следует относить, к парасимпатическому отделу ПНС. Большое разнообразие нейронов, отличающихся по морфологическим признакам (размерам, типу ветвлений дендритов и аксонов и типу синаптических окончаний), функциональной принадлежности (эфферентные, афферентные, ассоциативные, сенсомоторные, возбуждающие и ингибиторные), а также биохимическому статусу (экспрессия различных нейромедиаторов и регуляторных пептидов), позволяет осуществлять сложнейшие механизмы регуляции всех известных разновидностей перистальтики, обеспечения тканевого гомеостаза и барьерной функции эпителия слизистой оболочки толстого кишечника [2, 4, 7]. Принято считать, что парасимпатическая иннервация тканей ЖКТ преобладает над симпатической, поэтому она является более изученной.

Известно, что активация парасимпатической системы оказывает не только стимулирующее, но и тормозящее влияние на сократительную функцию стенки кишки, а симпатическая – главным образом, тормозящее. Было показано, что возбуждение симпатического отдела угнетает перистальтику толстой кишки, секрецию её желёз. Функциональная регуляция той и другой систем осуществляется через мембранные системы α - и β -адренорецепторов [1, 3, 6, 8].

Анализ данных литературы показывает, что проблема нервной регуляции ЖКТ человека и животных еще недостаточно изучена. Многие вопросы носят дискуссионный характер и требуют уточнения. Не решены вопросы о распределении симпатических нервных волокон в стенке ТКШ, их участии в иннервации ганглиозных сплетений, о представительстве симпатических аппаратов в подслизистой и слизистой оболочках, мышечных слоях, вокруг сосудов микроциркуляторного русла в норме и патологии [5, 9–11].

Цель настоящего исследования – выяснить распределение и особенности симпатической иннервации тканей стенки кишки человека при ХМТЗ с помощью иммуногистохимических методов.

Материалы и методы

Работа выполнена на резекционном материале, полученном на кафедре факультетской хирургии им. С. П. Федорова ВМедА им. С. М. Кирова. Объект исследования: фрагменты сигмовидной кишки и ободочной кишки, полученные в результате оперативного вмешательства по поводу хронического медленно-транзитного запора (ХМТЗ) (пять случаев, женщины в возрасте 37–40 лет). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [12]. После обезвоживания в спиртах возрастающей крепости и ксилоле материал заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Исследование было одобрено ЛЭК ФГБНУ ИЭМ (протокол № 3/19 от 25.04.2019). Иммуногистохимические (ИГХ) реакции проводили на парафиновых срезах [13]. Для иммуноцитохимического выявления белка PGP

9.5 применяли поликлональные кроличьи антитела (Spring Bioscience, США), для синаптофизина – кроличьи моноклональные антитела (клон SP11) (Spring Bioscience, США), для тирозингидроксилазы – поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания). В качестве вторичных реагентов применяли реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Часть препаратов докрашивали толуидиновым синим по Нисслию и астровым синим.

Для осуществления отрицательного контроля иммуногистохимических реакций на часть срезов вместо раствора первичных антител наносили их разбавитель (Dako, Denmark; сейчас Agilent, USA). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Germany) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Germany).

Результаты

Прежде чем перейти к изложению результатов, касающихся симпатической иннервации кишечника человека, следует дать краткую морфологическую оценку холинергических нервных аппаратов парасимпатического звена ЭНС толстого кишечника, для выявления которых служит универсальный нейроиммуногистологический маркер PGP 9.5. С помощью ИГХ реакции на PGP 9.5 на поперечных срезах через кольца различных отделов (ободочной и сигмовидной кишки) толстого кишечника постоянно выявляются два ганглиозных сплетения – межмышечное (ММС) Ауэрбахово и подслизистое (ПС) Мейснерово. На фоне мышечных слоев на гистологических препаратах наиболее четко проявляется миентеральное нервное сплетение (ММС). Оно состоит из многочисленных различной величины ганглиев, заключенных в широкопетлистое сплетение толстых и тонких тяжей безмиелиновых аксонов. Ганглии ММС встречаются как внутри тяжей, так и в местах их пересечения. Как видно на рисунке 1, сплетение располагается между продольным и циркулярным гладкомышечными слоями. Эти структуры хорошо видны, так как окрашиваются с помощью реакции на PGP 9.5 в черно-коричневый цвет (рис. 1).

От ганглиев ММС, граничащих непосредственно с мышечными слоями стенки кишки, в разные стороны отходят многочисленные тяжи нервных волокон. Одни из них направляются к продольному (обращенному к брыжейке), другие к циркулярному (на границе со слизистой оболочкой) слоям гладких мышц и формируют внутри них узкопетлистые терминальные сети холинергических варикозных аксонов, образующих аксомышечные синапсы типа *en passant*.

Подслизистое нервное сплетение (ПС), располагающееся в рыхлой соединительной ткани, состоит из тонких немиелинизированных нервных пучков и микроганглиев (5–10 нейронов) (рис. 1, в). В нем также присутствует большое количество регионарных сосудов, среди которых преобладают собирательные вены с широкими просветами, лимфатические сосуды, а также редкие артерии и артериолы.

В иннервации слизистой оболочки принимает участие часть пучков нервных волокон, проникающих из ПС через мышечную пластинку. В соединительной ткани крипт они образуют различной степени плотности терминальную синаптическую сеть из варикозных аксонов. Предполагается, что эти терминалы выполняют афферентную функцию.

Таким образом, анализ препаратов позволил заключить, что PGP 9.5-иммунореактивные холинергические нервные аппараты присутствуют во всех тканях стенки кишки и, следовательно, участвуют в иннервации всех ее оболочек.

Сравнительное исследование срезов, окрашенных с помощью PGP 9.5 или ТГ, позволило определить локализацию и распределение парасимпатических и симпатических нервных аппаратов в тканях и оболочках кишки. Между парасимпатическими и симпатическими структурами наблюдаются выраженные различия. Они проявляются не

только разницей выполняемых функций, выделяемых медиаторов, интенсивностью и плотностью иммуногистохимических реакций (PGP 9.5 – белок, ТГ – фермент), но и сложностью взаимоотношений с иннервируемыми тканями-мишенями. Те и другие волокна проходят в одних и тех же смешанных стволиках, пучках, органических сплетениях, а также в терминальных тяжах Ремака «основного концевое сплетения», будучи заключенными в сеть, состоящую из интерстициальных клеток Кахаля. Оба типа постганглионарных аксонов могут выходить из ремаковских тяжей и либо заканчиваться свободно, образуя дистантные синапсы на гладкомышечных клетках, либо формировать на нейронах ганглиев ЭНС истинные межнейронные синапсы.

Нами обнаружены существенные различия в топографии и распределении парасимпатических и симпатических структур в стенке толстой кишки. Парасимпатические аппараты присутствуют во всех трех оболочках (они составляют ганглии ЭНС, нервные сплетения мышечных тканей и периваскулярных нервных сплетений), в то время как катехоламинергические симпатические структуры локализуются только в определенных участках стенки толстой кишки (рис. 2 а, б).

Установлено, что основная масса постганглионарных симпатических претерминальных и терминальных варикозных аксонов обнаружена вокруг нейронов Ауэрбахова и Мейснерова сплетений в виде синаптических структур, известных как «перичеселлярные аппараты», а также в мышечной пластинке слизистой оболочки и в периваскулярных нервных сплетениях (рис. 5). Интересно отметить, что локализация симпатических нервных аппаратов тесно связана с ганглиями и их нейронами, они отсутствуют в межганглионарных нервных стволиках, а также в продольном, и в циркулярном мышечных слоях (рис. 2, б). Не были обнаружены симпатические элементы также в тканях слизистой оболочки.

У больных ХМТЗ во всех исследованных случаях были выявлены различной степени выраженности изменения межнейронных перичеселлярных синаптических аппаратов с утратой характерной для них структурной организации. В некоторых местах ММС можно встретить ганглии с небольшим числом сохранившихся нейронов с признаками, близкими к нормальному их морфологическому строению. С обеих сторон к ганглию подходят тонкие пучки безмиелиновых претерминальных симпатических аксонов, которые интенсивно ветвятся и образуют вокруг перикарионов ТГ-иммунонегативных холинергических нейронов перичеселлярные сплетения в виде «корзинок». Они состоят из тончайших варикозных (четко-образного вида) синаптических структур, и образуют типичные аксосоматические и аксондритные синапсы (рис. 2, в).

В других участках ММС встречаются ганглии с дистрофически измененными и погибшими нейронами (рис. 2, г). На данном рисунке можно проследить гипертрофированные и сильно

иммунореактивные пучки постганглионарных симпатических аксонов, окрашенных в черный цвет, проникающих в ганглий. В нем они делятся на тончайшие веточки варикозных аксонов и образуют беспорядочно расположенные четкообразные или бусинковидные зернистые структуры, располагающиеся среди патологически измененных нейронов и массой пролиферирующих глиальных клеток. Обращает на себя внимание, что расположенные в непосредственной близости с нервными элементами мышечные пучки находятся в состоянии выраженной контрактуры (рис. 2, г). Это свидетельствует о деструктивных и патологических изменениях не только в ганглиях, но и в окружающих мышцах.

В некоторых ганглиях был обнаружен другой тип патологических изменений, относящихся к собственно перичеселлярным аппаратам. На фоне сохранившихся, поврежденных и погибших нейронов видны различной формы гипертрофированные, обособленные или изолированные от аксонов синаптические бутоны в виде колечковидных, гранулярных и пластинчатых структур (рис. 3 а, б).

Наконец, наряду с описанными выше изменениями в ММС, встречаются ганглии не только с массивной гибелью нервных и волокнистых холинергических структур, но также с тяжелыми дегенеративными изменениями перичеселлярных симпатических аппаратов (рис. 3, в). Эти данные

несомненно свидетельствуют о существенных глубоких нарушениях регуляторной функции ганглиозного сплетения в изученных случаях толстой кишки при ХМТЗ.

В настоящей работе особое внимание было уделено изучению иннервации сосудов регионарного кровообращения ТКШ, встречающихся в основном в подслизистой оболочке. В одних случаях на одних и тех же срезах, окрашенных на РGP 9.5, можно видеть иммунореактивные парасимпатические сплетения, микроганглии, нейромышечные синапсы в собственной пластинке слизистой. Однако вокруг крупных венозных сосудов холинергические сплетения часто не выявляются (рис. 4, а), исключение составляют мелкие вены. В то же время катехоламинергические терминалы симпатических волокон при окраске на ТГ выявляются вокруг крупных и мелких вен с определенной постоянностью (рис. 4 в, г). Оказалось, что наиболее интенсивно иннервированы мелкие венозные сосуды (рис. 4, г). Их периваскулярная сеть аксонов более плотная по сравнению с крупными расширенными венами, в которых часто наблюдается стаз эритроцитов (рис. 4, в).

Эта закономерность связана, по нашему мнению, с особенностями оттока венозной крови, богатой питательными веществами, от слизистой оболочки в близко расположенную узкопетлистую плотную венозную сеть сосудов подслизистой оболочки.

Обсуждение

По данным литературы большинство исследований, посвященных проблеме симпатической иннервации при нарушении функций желудочно-кишечного тракта, проводятся на животных. В настоящее время известно более 60 экспериментальных моделей, воспроизводящих язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника, генно-инженерные болезни, химически индуцированные патологии и др. [5, 10, 11, 14–16]. В этих работах приводятся данные об изменениях в структуре и функции холинергических и норадренергических нервных волокон, иннервирующих кишечную стенку. Хотя эти модели полностью не воспроизводят сложность болезни человека, они являются ценными инструментами для изучения многих важных аспектов патофизиологических механизмов и способствуют разработке новых терапевтических стратегий [17].

Малоизученными остаются вопросы изменения симпатической иннервации стенки различных отделов толстого кишечника. Имеется ряд исследований, выполненных на обезьянах, в которых авторы изучали формирование запоров при болезни Паркинсона [9]. Было показано, что индуцированная нейротоксином 6-hydroxydopamine (6-OHDA) нарушение катехоламинергической иннервации приводит к изменениям в миентеральном ганглиозном сплетении толстой кишки обезьян.

Используя препарат оксалиплатина, применяемый для лечения в онкологии, в эксперименте на мышах показано, что он оказывает токсическое действие на иннервацию кишечника и приводит

к изменениям нервных структур, проявляющееся в гибели нейронов, снижении плотности адренергических и холинергических нервных волокон, меченых ИГХ-методами на кальцитонин-ген-связанный пептид (CGRP), ТГ, везикулярный переносчик ацетилхолина (VACht) и глиальный маркер – белок S100 [10]. Авторы сделали вывод о том, что лечение оксалиплатином может значительно изменять иннервацию толстой кишки.

Используя трансгенных животных (мышей Winnie) с мутацией по гену муцина Muc2, изучали развитие воспаления толстого кишечника, возникающее из-за первичного эпителиального дефекта [11]. У этой линии мышей проявляются симптомы диареи, язв и признаки воспаления стенки толстого кишечника. Было установлено, что плотность сенсорных, холинергических и адренергических нейронов и нервных волокон миентерального сплетения, иннервирующих мышцы и слизистую, значительно снижается.

Имеется ряд работ посвященных также исследованию заболеваний тонкого и толстого кишечника человека, включая ХМТЗ [5, 18–23]. Однако большинство из них выполнено не морфологическими, а инструментально-клиническими методами. Так, Raethjen et al. (1997) [18] провели клиническое исследование больных с хроническим идиопатическим запором. С помощью физиологических тестов на потоотделение, а также оценки тепловых порогов и рефлекторной вазодилатации в ответ на внутрикожное введение капсаицина, авторы обнаружили дисфункцию нервной регуляции. Было

сделано предположение о том, что у пациентов с тяжелыми хроническими запорами наблюдаются признаки идиопатической нейропатии. Авторы предполагают, что в основе нейропатии лежат изменения безмиелиновых симпатических и парасимпатических волокон.

Проведенное нами с помощью нейроиммуногистохимических маркеров сравнительное исследование позволило не только установить присутствие симпатических нервных структур, выяснить их распределение в стенке кишки, но и продемонстрировать ряд существенных особенностей нарушения иннервации тканей толстого кишечника у больных ХМТЗ (см. схему на рис. 5).

Результаты настоящего исследования показали, что основная масса симпатических нервных волокон и их синаптических окончаний, известных как, перичеселлярные аппараты локализуется вокруг многочисленных холинергических нейронов Ауэрбахова и Мейснерова сплетений. У больных ХМТЗ обнаружены выраженные реактивные, дистрофические и дегенеративные изменения этих синаптических аппаратов, что свидетельствует о нарушении функций ганглиозных сплетений ЭНС. Отмечены случаи частичной денервации периваскулярных нервных сплетений вокруг венозных сосудов в подслизистой оболочке, что свидетельствует о нарушении оттока крови из стенки исследуемых отделов кишки. Нами получены данные об отсутствии симпатической иннервации в продольном и циркулярном слоях мышечной оболочки, и наоборот – отмечено обилие в них холинергических терминальных сетей – дистантных синапсов типа «en passant», хорошо выявляемых с помощью ИГХ-реакций на синаптофизин и на белок PGP 9.5. Это свидетельствует о преобладающей роли в иннервации мышечных тканей стенки толстой кишки именно парасимпатических нервных структур.

Выводы

1. В исследованных отделах толстого кишечника основная масса постганглионарных симпатических нервных волокон обнаружена вокруг нейронов Ауэрбахова и Мейснерова сплетений. Их терминальные варикозные аксоны образуют вокруг перикарионов холинергических нейронов перичеселлярные синапсы, медиатором которых служит норадреналин.
2. Показано, что мышечная оболочка стенки кишки иннервируется не симпатическими, а парасимпатическими нервными волокнами, терминальные варикозные аксоны которых образуют нейро-мышечные синапсы дистантного типа (en-passant).
3. Выяснено, что симпатические волокна участвуют в иннервации клеток мышечной пластинки

Особый интерес представляет вопрос об особенностях иннервации слизистой оболочки. С помощью сравнительного ИГХ-анализа выяснилось, что у исследованных больных в слизистой оболочке толстой кишки, как и в остальных слоях стенки, преобладают PGP 9.5+ парасимпатические нервные волокна, в то время как ТН+ симпатические нервные волокна и их терминальные структуры отсутствуют. Однако каковы функции этих парасимпатических структур, их значения в иннервации тканей слизистой до сих пор не вполне выяснены.

Слизистая оболочка, содержащая разные клеточные элементы (клетки эпителия, ГМК, эндотелия сосудов, соединительнотканые элементы, иммунные, энтерохромафинные и тучные клетки), богата иннервирована парасимпатическими холинергическими волокнами, которые представлены, по-видимому, как эфферентными, так и афферентными терминальными аксонами. Несколько лет назад с помощью применения метода антеградного мечения декстран-амином и ИГХ-реакции на CGRP в различных тканях мышей, включая слизистую оболочку, были идентифицированы различные типы первичных афферентных нервных окончаний [24]. В настоящей работе у некоторых больных, особенно с признаками выраженного воспаления (гипертрофии ЛУ, увеличения лейкоцитарных инфильтратов, включая тучные клетки в области крипт), мы наблюдали заметное повышение плотности парасимпатических структур в слизистой и подслизистой оболочках. Эти данные свидетельствуют о развитии хронического нейроиммунного воспаления у таких больных [25]. Ранее Lomax et al. (2010) [5] отмечали взаимосвязь симпатических нервных волокон с иммунным воспалением в кишечнике. Этот вопрос требует дальнейшего углубленного исследования.

слизистой оболочки, а также в иннервации венозных сосудов подслизистой основы.

4. В изученных отделах толстого кишечника симпатические нейроны не обнаружены.
5. Установлены существенные особенности нарушения симпатической иннервации толстого кишечника исследованных больных, обнаружены морфологические признаки реактивных, дистрофических и тяжелых дегенеративных изменений синаптических аппаратов в ганглиозных сплетениях.
6. Предполагается, что выявленные патологические изменения симпатической иннервации при ХМТЗ могут служить одной из основных причин нарушения нормальных функций кишечника.

Литература | References

1. Nozdrachev A. D. Physiology of the autonomic nervous system. L., Medicine Publ., 1983. (In Russ.)
Ноздрачев А. Д. Физиология вегетативной нервной системы. – Л.: Медицина, 1983.
2. Nozdrachev A. D., Chumasov E. I. Peripheral nervous system. St. Petersburg, Nauka Publ., 1999. (In Russ.)
Ноздрачев А. Д., Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. – СПб.: Наука, 1999.
3. Pokrovsky V. M., Korotko G. F. Human physiology. Moscow, Medicine Publ., 2003. (In Russ.)
Покровский В. М., Коротко Г. Ф. Физиология человека. – М.: Медицина, 2003.
4. Furness J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000 Jul 3;81(1–3):87–96. doi: 10.1016/s0165–1838(00)00127–2.
5. Lomax A. E., Sharkey K. A., Furness J. B. The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Jan;22(1):7–18. doi: 10.1111/j.1365–2982.2009.01381.x.
6. Galeisya E. N., Lychkova A. E. Nervous regulation of the colon. *Experimental and clinical gastroenterology.* 2013(8):54–60. (In Russ.)
Галейся Е. Н., Лычкова А. Э. Нервная регуляция толстой кишки // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2013. – № 8. – С. 54–60.
7. Gabella G. Structure of the autonomic nervous system. London. Chapman and Hall, 1979.
8. Lolova I., Itzev D., Davidoff M. Z. Innervation of the smooth muscle in human large intestine during ontogenesis. *Mikrosk Anat Forsch.* 1987;101(5):871–80. PMID: 3328440.
9. Shultz J. M., Resnikoff H., Bondarenko V. et al. Neurotoxin-Induced Catecholaminergic Loss in the Colonic Myenteric Plexus of Rhesus Monkeys. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2016 Nov;6(6):279. doi: 10.4172/2161–0460.1000279.
10. Stojanovska V., McQuade R. M., Miller S., Nurgali K. Effects of Oxaliplatin Treatment on the Myenteric Plexus Innervation and Glia in the Murine Distal Colon. *J Histochem Cytochem.* 2018 Oct;66(10):723–736. doi: 10.1369/0022155418774755.
11. Rahman A. A., Robinson A. M., Jovanovska V., Eri R., Nurgali K. Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. *Cell Tissue Res.* 2015 Dec;362(3):497–512. doi: 10.1007/s00441–015–2251–3.
12. Korzhevskii D. E., Sukhorukova E. G., Gilerovich E. G., et al. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2014;44(5):542–545. doi: 10.1007/s11055–014–9948–8.
13. Chumasov E. I., Kolos E. A., Petrova E. S., Korzhevsky D. E. Immunohistochemistry of the peripheral nervous system. St. Petersburg. SpecLit Publ., 2020. (In Russ.)
Чумасов Е. И., Колос Е. А., Петрова Е. С., Коржевский Д. Э. Иммуногистохимия периферической нервной системы. – СПб.: СпецЛит, 2020.
14. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;105:263–320. doi: 10.1016/B978–0–12–394596–9.00009–3.
15. Straub R. H., Stebner K., Härle P., et al. Key role of the sympathetic microenvironment for the interplay of tumour necrosis factor and interleukin 6 in normal but not in inflamed mouse colon mucosa. *Gut.* 2005 Aug;54(8):1098–106. doi: 10.1136/gut.2004.062877.
16. Swain M. G., Blennerhassett P. A., Collins S. M. Impaired sympathetic nerve function in the inflamed rat intestine. *Gastroenterology.* 1991 Mar;100(3):675–82. doi: 10.1016/0016–5085(91)80011-w.
17. Wirtz S., Neufert C., Weigmann B., Neurath M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc.* 2007;2(3):541–6. doi: 10.1038/nprot.2007.41.
18. Raethjen J., Pilo A. M., Knowles C., et al. Selective autonomic and sensory deficits in slow transit constipation. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 1997 Sep 10;66(1–2):46–52. doi: 10.1016/s0165–1838(97)00043-x.
19. Tillou J., Poylin V. Functional Disorders: Slow-Transit Constipation. *Clin Colon Rectal Surg.* 2017 Feb;30(1):76–86. doi: 10.1055/s-0036–1593436.
20. Yeh K. M., Johansson O., Le H., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulates enteric cholinergic activities and is abnormally expressed in the enteric ganglia of patients with slow transit constipation. *J Gastroenterol.* 2019 Nov;54(11):994–1006. doi: 10.1007/s00535–019–01610–9.
21. Zhong Z. H., Yang S., Zhao Y., et al. Comparison of laparoscopic selective colectomy based on barium-strip examination and subtotal colectomy for adult slow-transit constipation. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2019 Jul 16;7(5):361–366. doi: 10.1093/gastro/goz020.
22. Bassotti G. Cellular and molecular basis of chronic constipation: Taking the functional/idiopathic label out. *World Journal of Gastroenterology.* 2013 Jul 14;19(26):4099–105. doi: 10.3748/wjg.v19.i26.4099.
23. Ghoshal U. C., Sachdeva S., Pratap N., et al. Indian consensus on chronic constipation in adults: A joint position statement of the Indian Motility and Functional Diseases Association and the Indian Society of Gastroenterology // *Indian J Gastroenterol.* 2018 Nov;37(6):526–544. doi: 10.1007/s12664–018–0894–1.
24. Spencer N. J., Kyloh M., Duffield M. Identification of different types of spinal afferent nerve endings that encode noxious and innocuous stimuli in the large intestine using a novel anterograde tracing technique. *PLoS One.* 2014 Nov 10;9(11): e112466. doi: 10.1371/journal.pone.0112466.
25. Chumasov E. I., Romashchenko P. N., Maistrenko N. A. et al. Pathohistological study of the ganglionic plexuses of the sigmoid colon in patients with chronic slow-transit constipation. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2021;3(75):117–124. (In Russ.) doi: 10.17816/brmma75673.
Чумасов Е. И., Ромащенко П. Н., Майстренко Н. А. и др. Патогистологическое исследование ганглиозных сплетений сигмовидной кишки больных хроническим медленно-транзитным запором // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2021. – № 3(75). – С. 117–124. doi: 10.17816/brmma75673.

К статье

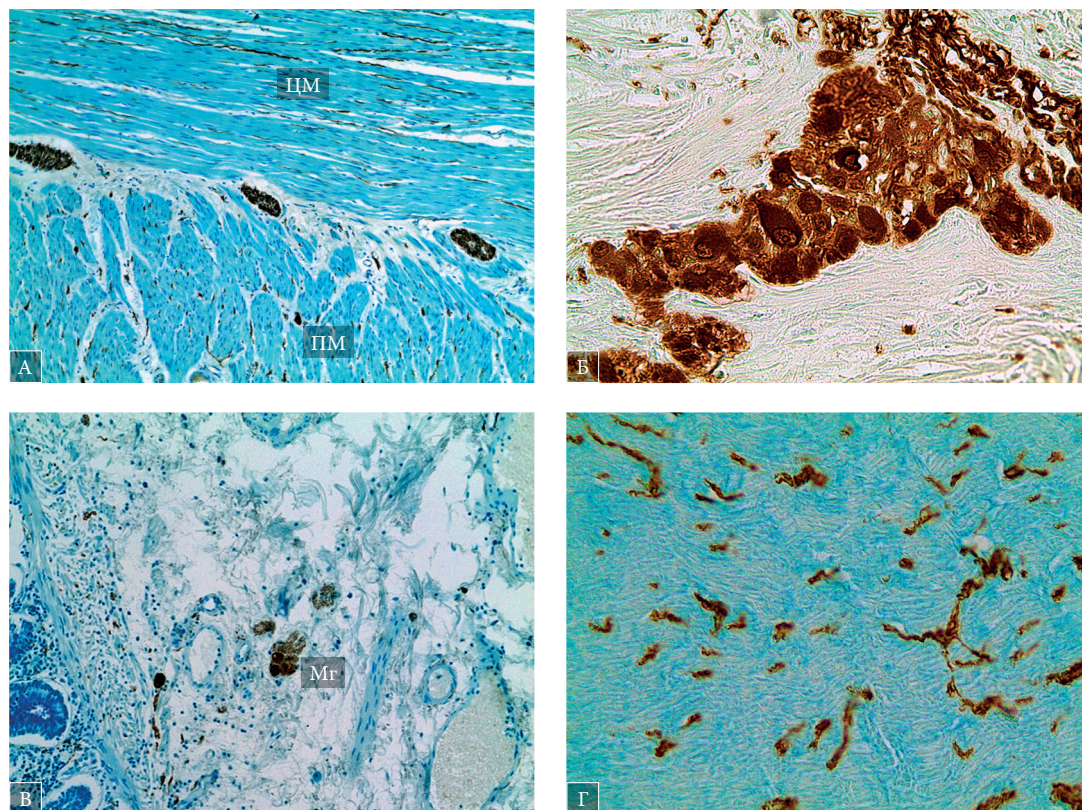
Иммуногистохимическое исследование симпатической иннервации толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре (стр. 191–197)

To article

Immunohistochemical study of the sympathetic innervation of the colon in chronic slow-transit constipation (p. 191–197)

Рисунок 1.
PGP 9.5-иммуно-
нопозитивные
парасимпати-
ческие нервные
структуры в стенке
сигмовидной киш-
ки больных (случаи
№ 1, 2).

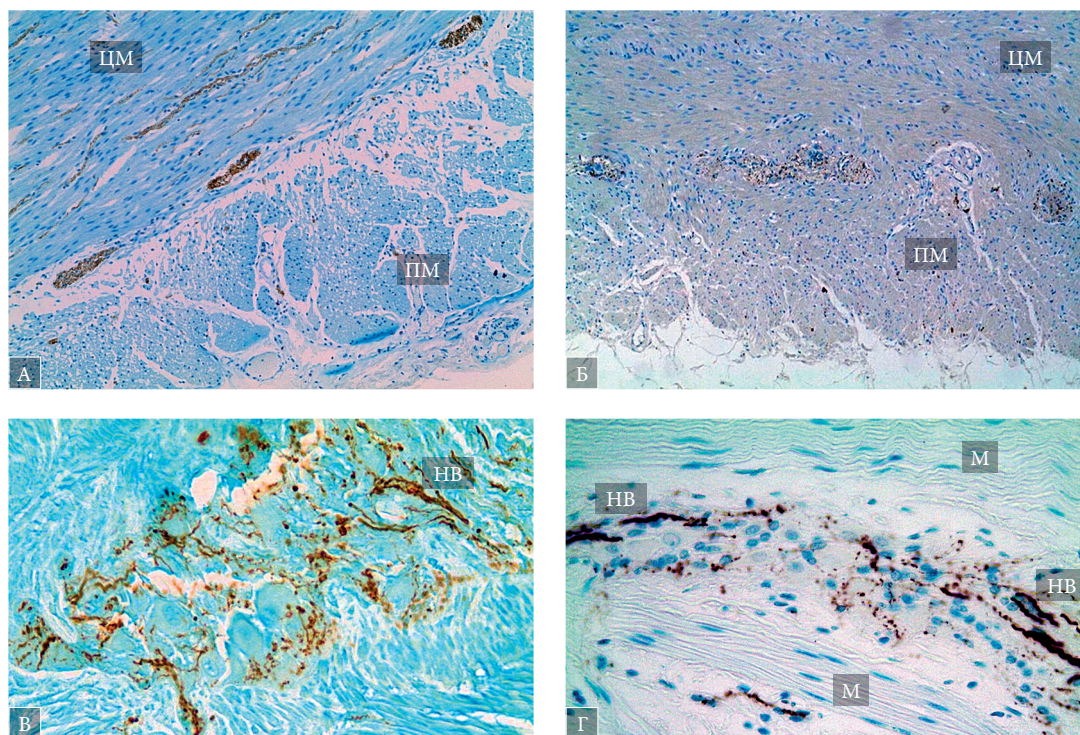
Figure 1.
PGP 9.5-immu-
nopositive para-
sympathetic nerve
structures in the
wall of the sigmoid
colon of patients
(cases No. 1, 2).



а – общий вид миентерального ганглиозного сплетения; б – фрагмент ганглия; в – фрагмент подслизистого ганглиозного сплетения; г – терминальная синаптическая сеть аксонов, иннервирующих гладкомышечные клетки продольного мышечного слоя. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5. Подкраска толуидиновым синим (а, в), астровым синим (г). Мг – микроганглий, ПМ – продольная мышца; ЦМ – циркулярная мышца. Ув.: $\times 100$ (а, в); $\times 400$ (б, г)

a – myenteric ganglionic plexus; b – ganglion fragment; c – a fragment of the submucosal ganglionic plexus; d – terminal synaptic network of axons innervating smooth muscle cells of the longitudinal muscle layer. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5. Toluidine blue staining (a, c), astra-blue staining (d). Mg, microganglion; LM – longitudinal muscle; CM – circular muscle. $\times 100$ (a, c); $\times 400$ (b, d)

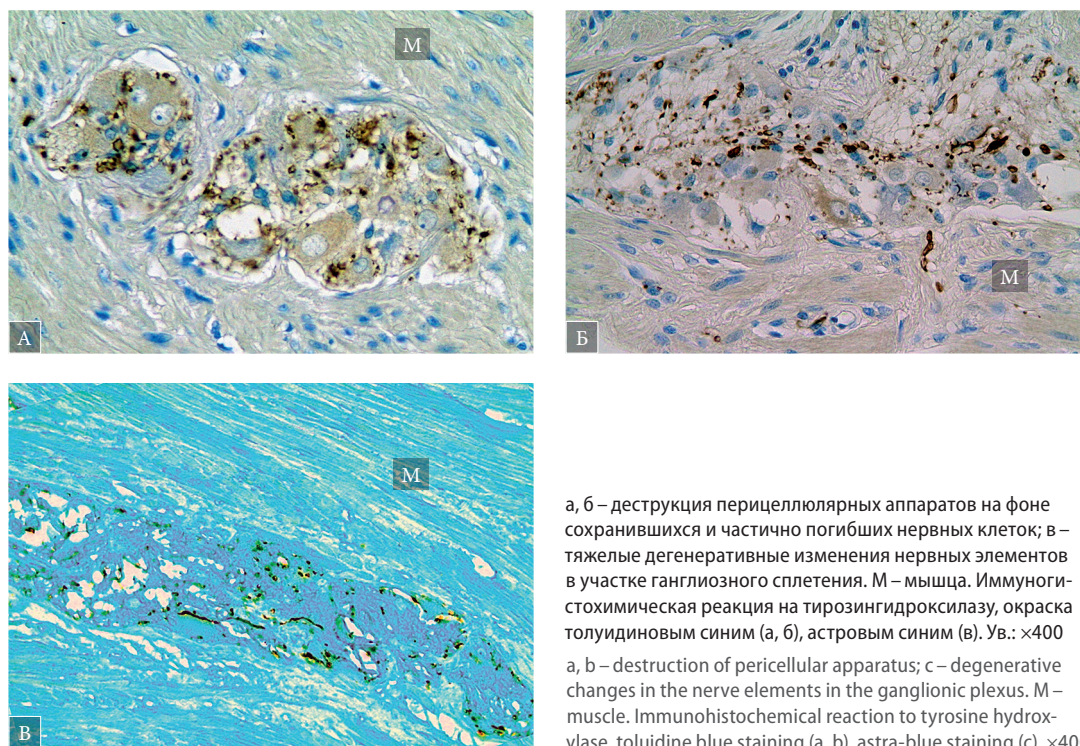
Рисунок 2.
Холинергические ганглии миентерального сплетения и иннервирующие их симпатические постганглионные нервные волокна.
Figure 2.
Cholinergic ganglia of the myenteric plexus and the sympathetic postganglionic nerve fibers innervating them.



а, б – ганглии миентерального сплетения; в, г – синаптические аппараты вокруг холинергических нейронов (в стенке толстой кишки человека (случай № 1, 2). ПМ – продольный мышечный слой; ЦМ – циркулярный мышечный слой; НВ – претерминальные нервные волокна; М – пучки гладкомышечных клеток в состоянии контрактуры. Иммуногистохимические реакции на белок PGP 9.5 (а); на тирозингидроксилазу (б, в, г), окраска толуидиновым синим (а, б, г) и астровым синим (в). Ув.: $\times 100$ (а, б), $\times 400$ (в, г)

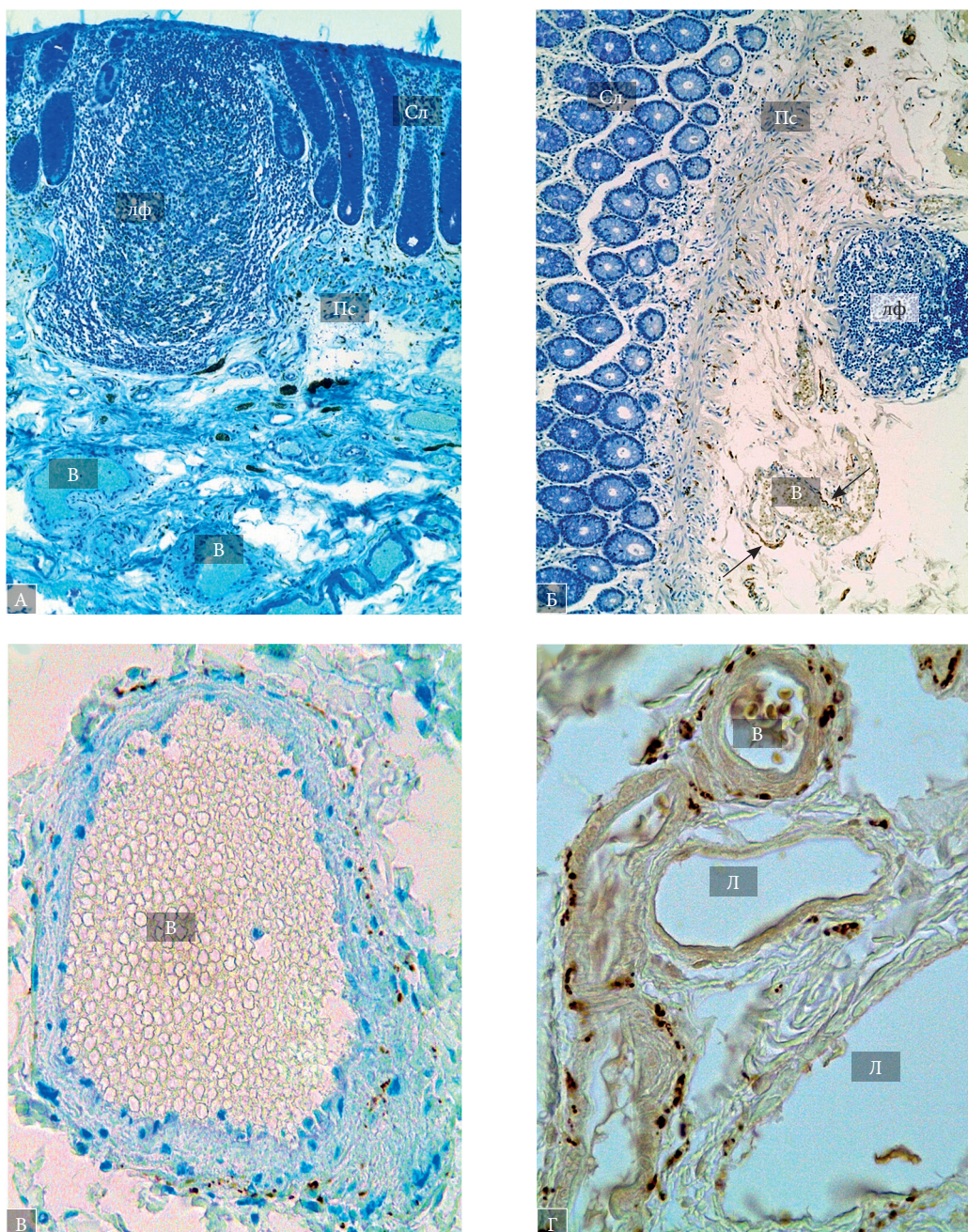
a, b – ganglia of the myenteric plexus; c, d – synaptic apparatus around cholinergic neurons (in the wall of the human colon (cases 1, 2). LM – longitudinal muscle layer; CM – circular muscle layer; NF – preterminal nerve fibers; M – bundles of smooth muscle cells in a state of contracture. Immunohistochemical reactions to protein PGP 9.5 (a), to tyrosine hydroxylase (b, c, d), toluidine blue staining (a, b, d), astra-blue staining (c). $\times 100$ (a, b), $\times 400$ (c, d)

Рисунок 3.
Изменения нервных клеток и симпатических нервных аппаратов миентерального ганглиозного сплетения (случай № 2, 3).
Figure 3.
Changes in nerve cells and sympathetic nerve apparatus of the myenteric ganglionic plexus (cases No. 2, 3).



а, б – деструкция перичеселлярных аппаратов на фоне сохранившихся и частично погибших нервных клеток; в – тяжелые дегенеративные изменения нервных элементов в участке ганглиозного сплетения. М – мышца. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу, окраска толуидиновым синим (а, б), астровым синим (в). Ув.: $\times 400$
a, b – destruction of pericellular apparatuses; c – degenerative changes in the nerve elements in the ganglionic plexus. M – muscle. Immunohistochemical reaction to tyrosine hydroxylase, toluidine blue staining (a, b), astra-blue staining (c). $\times 400$

Рисунок 4.
 Иннервация
 стенок венозных
 сосудов в подсли-
 зистой оболочке
 кишки человека
 (случаи № 4, 5).
Figure 4.
 Innervation of the
 walls of venous
 vessels in the
 submucosa of the
 human colon (cases
 No. 4, 5).



а – отсутствие холинергической иннервации вокруг вен; б-г – наличие симпатической иннервации венозных сосудов в подслизистой оболочке кишки (стрелки). ЛФ –лимфатический фолликул; Л – лимфатические сосуды; Сл – слизистая оболочка; Пс – подслизистая оболочка; В – вены. Иммуногистохимические реакции на белок PGP 9.5 (а) и тирозингидроксилазу (б, в, г). Подкраска толуидиновым синим (а, б, в). Ув.: $\times 100$ (а, б); $\times 400$ (в, г).

a – lack of cholinergic innervation around the veins; b-d – the presence of sympathetic innervation of venous vessels in the submucosa of the colon (arrows). LF – lymphatic follicle; L – lymphatic vessels; Mm – mucous membrane; S – submucosa; V – veins. Immunohistochemical reactions to PGP 9.5 protein (a) and tyrosine hydroxylase (b, c, d). Toluidine blue staining (a, b, c). $\times 100$ (a, b); $\times 400$ (c, d).

Рисунок 5.

Схема распределения симпатических постганглионарных нервных волокон и их терминальных аппаратов в тканях стенки толстой кишки человека. I – слизистая оболочка; II – подслизистая основа; III – мышечная оболочка; НВ – симпатические нервные волокна; 1 – мышечная пластинка слизистой оболочки; 2 – венозные кровеносные сосуды; 3 – Мейснерово ганглиозное сплетение; 4 – циркулярный мышечный слой; 5 – Ауэрбахово ганглиозное сплетение; 6 – продольный мышечный слой; 7 – серозная оболочка

Figure 5.

Scheme of distribution of sympathetic postganglionic nerve fibers and their terminals in the tissues of the human colon wall. I – mucous membrane; II – submucosa; III – muscular membrane; NF, sympathetic nerve fibers; 1 – muscular plate of the mucous membrane; 2 – venous blood vessels; 3 – Meisner's ganglionic plexus; 4 – circular muscle layer; 5 – Auerbach's ganglionic plexus; 6 – longitudinal muscle layer; 7 – serous membrane

