

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

На правах рукописи

Хочанский Дмитрий Николаевич

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ЭНТЕРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ И
ХРОНИЧЕСКОМ КОЛИТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научные руководители
д.м.н., профессор О.В. Макарова
д.м.н., С.В. Буравков**

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы в норме	10
1.2. Морфологические изменения энтеральной нервной системы при воспалительных заболеваниях кишечника	25
1.3. Механизмы повреждения, гибели и пластичности энтеральных нейронов	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Общая характеристика материала.....	37
2.2. Методы исследования	39
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
3.1. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 в норме	54
3.2. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите	86
3.3. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите	129
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	157
ВЫВОДЫ	174
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	176

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ДСН – декстрансульфат натрия

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ – иммуногистохимия, иммуногистохимический

ИФ – иммунофлуоресценция, иммунофлуоресцентный

СПСО – собственная пластинка слизистой оболочки

ТНБС – тринитробензолсульфоновая кислота

ДНБС – динитробензолсульфоновая кислота

ЭМ – электронная микроскопия

ЭНС – энтеральная нервная система

ЯК – язвенный колит

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Энтеральная нервная система (ЭНС) - собственная нервная система органов желудочно-кишечного тракта. Несмотря на более чем 150-летнюю историю изучения, она остается одной из наименее исследованных структур периферической нервной системы (Furness J., 2006, 2012). ЭНС представлена на всем протяжении желудочно-кишечного тракта двумя основными сплетениями – миентеральным (межмышечным) и субмукозным (подслизистым). Эти сплетения образованы интрамуральными ганглиями, которые содержат нейроны, глиальные клетки и нейропилы, нервными трактами, соединяющими ганглии, и нервными волокнами в мышечной оболочке, подслизистой основе и собственной пластинке слизистой оболочки (Furness J., 2006, 2012). Энтеральные нейроны характеризуются гетерогенностью и представлены афферентными, интер- и мотонейронами (Фоканова О.А., Румянцева Т.А., 2006; Wood J., 2011; Kandel E. et al., 2013). Энтеральные глиальные клетки различаются по морфологии и локализации, они располагаются в ганглиях и по ходу нервных волокон. Среди них выявляются прогениторные клетки, способные к глиогенезу и, возможно, нейрогенезу (Joseph N. et al., 2011; Gulbransen B., Brown I., 2014; Belkind-Gerson J. et al., 2015; Grubišić V., Gulbransen B., 2017; Kulkarni S. et al., 2017).

Возрастающий интерес к изучению ЭНС связан с ее важной ролью в патогенезе многих заболеваний, в том числе воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит (Cirillo C. et al., 2011). Публикации, посвященные исследованию ЭНС при язвенном колите у человека, ограничены небольшим числом работ, и представленные в них данные фрагментарны и противоречивы (Geboes K., Collins S., 1998; Cirillo C. et al., 2011). Это связано со сложностями в получении тканевого материала, стандартизации пациентов по полу, возрасту, течению заболевания и лечению (Cirillo C. et al., 2011). В связи с этим изменения ЭНС активно изучают на моделях колита у разных видов лабораторных животных. Однако морфофункциональная организация ЭНС у мышей, несмотря на их широкое применение в биомедицинских исследованиях, изучена в меньшей степени, чем у других лабораторных животных.

Экспериментальная модель колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, является наиболее приближенной к язвенному колиту у человека. Эта модель была предложена Т. Ohkusa в 1985 г. и детально описана I. Okayasu et al. (1990 г.). Основным механизмом действия декстрансульфата натрия является нарушение эпителиального барьера толстой кишки с последующей транслокацией микрофлоры и развитием инфекционно-воспалительного процесса (Абдулаева С.О., 2012).

Степень разработанности темы исследования. Морфологические изменения ЭНС при экспериментальном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, охарактеризованы в относительно небольшом числе работ, и сведения, представленные в них, противоречивы. Так, показано как уменьшение количества энтеральных нейронов (Gulbransen V., Brown I., 2014; Moynes D. et al., 2014), так и увеличение их числа (Belkind-Gerson J. et al., 2015), или же отсутствие структурных изменений нейронов в миентеральных ганглиях (Mizuta Y. et al., 2000; Winston J. et al., 2013; Blennerhassett M. et al., 2016). При остром колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, выявляются увеличение числа нервных волокон в мышечной оболочке (Blennerhassett M. et al., 2016; Cervi A. et al., 2017) и пролиферация глии без увеличения числа глиальных клеток (Belkind-Gerson J. et al., 2015). При хроническом колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, в мышечной оболочке ободочной кишки отмечается пролиферация глии (Joseph N. et al., 2011) с увеличением числа тирозин гидроксилаза-позитивных волокон (Cervi A. et al., 2017).

Таким образом, структурная организация ЭНС у мышей в норме и ее изменения при язвенном колите изучены недостаточно, во многих аспектах освещены противоречиво, что требует исследований в этой области.

Цель исследования - охарактеризовать морфофункциональную организацию энтеральной нервной системы ободочной кишки в норме и ее изменения при остром и хроническом колите, индуцированном декстрансульфатом натрия у половозрелых самцов мышей C57Bl/6.

Задачи исследования:

1. Исследовать гистоархитектонику миентерального и субмукозного нервных сплетений ободочной кишки на гистологических препаратах, окрашенных по методу Ниссля, и на тотальных препаратах в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите.
2. Провести количественную оценку HuC/D-положительных нейронов и S100b-позитивных глиальных клеток в миентеральном нервном сплетении на тотальных препаратах мышечной оболочки в норме и при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите.
3. Охарактеризовать клеточный состав миентеральных ганглиев и изменения морфофункционального состояния энтеральных нейронов и глиальных клеток на гистологических препаратах, окрашенных по методу Ниссля и маркированных иммунофлуоресцентными методами с применением антител к HuC/D, S100b, nNOS, каспазе-3 и Ki67 в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите.

4. Провести морфометрическое исследование сети β III-тубулин и S100 β -положительных структур миентерального и субмукозного сплетения на гистологических срезах ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите.

5. Исследовать ультраструктуру нейронов, их отростков и глиальных клеток миентерального и субмукозного нервных сплетений в норме и при экспериментальном остром колите.

Объект и предмет исследования – миентеральное и субмукозное нервные сплетения ободочной кишки мыши, их структурные изменения при экспериментальном остром и хроническом колите.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов в области структурно-функциональной организации энтеральной нервной системы в норме и ее морфологических изменений при воспалительных заболеваниях кишечника.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций соответствующей научной тематики.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 5, 6, 7.

Научная новизна исследования. Впервые с помощью комплекса морфологических методов охарактеризована структурно-функциональная организация миентерального и субмукозного нервных сплетений ободочной кишки у мышей C57Bl/6 в норме и при экспериментальном язвенном колите. Установлено, что в норме в миентеральных ганглиях преобладают гипо- и нормохромные нейроны, а в цитоплазме большинства энтеральных нейронов содержится небольшое количество гранул каспазы-3.

При экспериментальном остром колите наблюдается компактизация миентерального нервного сплетения с увеличением числа миентеральных ганглиев и нейронов, площади и количества внутримышечных нервных волокон. Нервные тракты истончаются и становятся извитыми. Морфофункциональные изменения нейронов миентеральных ганглиев характеризуются снижением доли гипохромных и нитрергических нейронов и увеличением нейронов, содержащих большое количество каспаза-3-положительных гранул. При ультраструктурном исследовании в миентеральном сплетении отмечается дегенерация отдельных аксонов.

В субмукозном сплетении ободочной кишки при остром колите морфофункциональные изменения более выражены, чем в миентеральном: возрастают площадь, количество и средний диаметр β III-тубулин-положительных нервных волокон и

число S100b-позитивных клеток. На ультраструктурном уровне в отдельных аксонах субмукозных нервных волокон отмечаются признаки дегенерации.

При экспериментальном хроническом колите наблюдается гиперплазия ВШ-тубулин-положительных нервных волокон в циркулярном слое мышечной оболочки ободочной кишки, где их площадь и количество возрастают. В миентеральных ганглиях дистального отдела ободочной кишки увеличивается доля гиперхромных нейронов, а в медиальном уменьшаются их размеры. В собственной пластинке слизистой оболочки возрастает количество S100b-положительных клеток.

Методология и методы исследования. Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: оценка клинических проявлений колита и функционального состояния толстой кишки, гистологические, иммуногистохимические, иммунофлуоресцентные, электрономикроскопические, морфометрические, статистические методы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты настоящего исследования расширяют представления о морфофункциональной организации ЭНС у мышей в норме, при остром и хроническом колите. Полученные данные о структурных нарушениях ЭНС при экспериментальном остром и хроническом колите следует учитывать при изучении ЭНС у человека и экспериментальных животных. Разработанные методы исследования ЭНС, позволяющие дать детальную качественную и количественную характеристику ее структур, могут быть использованы при проведении научных исследований в области нейрогастроэнтерологии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Миентеральное и субмукозное нервные сплетения у мыши в норме характеризуются сложной трехмерной гистоархитектоникой и состоят из ганглиев, нервных трактов и нервных волокон. Среди нейронов миентерального сплетения преобладают гипо- и нормохромные, нитергические нейроны составляют 27% от общего числа, в большинстве нейронов содержится небольшое количество гранул каспазы-3.

2. При экспериментальном остром колите наблюдается компактизация миентерального нервного сплетения ободочной кишки с увеличением количества миентеральных ганглиев, их нейронов и нервных волокон в мышечной оболочке. Выявляются морфофункциональные изменения нейронов в миентеральных ганглиях с уменьшением их размеров, снижением доли гипохромных и нитергических нейронов и повышением в них числа каспаза-3 положительных гранул. Наблюдается истончение нервных трактов и снижение числа глиальных клеток.

3. При остром колите в субмукозном сплетении изменения более выражены, чем в миентеральном: многократно увеличиваются площадь и количество, диаметр β III-тубулин-положительных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки, в несколько раз возрастает число S100b-позитивных клеток. В тоже время лишь в отдельных аксонах обнаруживаются ультраструктурные признаки дегенерации.

4. При экспериментальном хроническом колите в миентеральных ганглиях выявляются морфофункциональные изменения нейронов с увеличением среди них числа гиперхромных, отмечается гиперплазия нервных волокон в мышечной оболочке и увеличение количества S100b-позитивных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования, их решением, использованием современных методов исследования, достаточным объемом данных для каждой экспериментальной группы, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы. Основные положения и материалы диссертации были доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях: XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, 2013); VI Архангельская международная медицинская научная конференция молодых ученых и студентов (к 80-летию Северного медицинского государственного университета) (Архангельск, 2013); Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014); Международная конференция «PhD Scientific Days 2015» (Будапешт, Венгрия, 2015); «19-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых» (Пушино, 2015); Всероссийская конференция с международным участием «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015); Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016); Международная конференция «2nd Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting» (Сан-Франциско, США, 2016); Международная конференция «PhD Scientific Days 2017» (Будапешт, Венгрия, 2017); Международная конференция NeuroGASTRO 2017 (Корк, Ирландия, 2017).

Личное участие автора заключалось в проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, формулировке научных положений и выводов, подготовке и публикации статей по результатам исследования.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых ВАК РФ научных

изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 обзор литературы и 10 публикаций в материалах всероссийских и международных научных конференций.

Внедрение результатов исследования. Материалы диссертационного исследования используются в лекционном курсе на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 191 странице машинописного текста, содержит 18 таблиц, иллюстрирована 81 рисунком. Список литературы включает 218 источника отечественных и иностранных авторов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы в норме

Энтеральная нервная система (ЭНС) – собственная нервная система желудочно-кишечного тракта. По отечественной классификации она входит в состав метасимпатической нервной системы, которая включает также собственные интрамуральные ганглии мочевыводящей и половой системы, сердца и ряда других органов с автономной сократительной активностью (Ноздрачев А.Д., 1983). ЭНС играет важную роль как в нормальном функционировании ЖКТ, так при различных заболеваниях органов ЖКТ. Несмотря на более чем 150-летнюю историю изучения ЭНС, она остается одним из наименее исследованных отделов нервной системы. Так, в фундаментальном руководстве «Principles of Neural Science» под редакцией Eric R. Kandel, James H. Schwartz и Thomas M. Jessell (2013) ей в сумме посвящена одна страница из 1700. Морфофункциональная организация ЭНС у мышей, широко применяющихся в настоящее время в биомедицинских исследованиях, изучена в меньшей степени, чем других лабораторных животных.

Современные представления о пренатальном развитии энтеральной нервной системы

Подобно другим отделам автономной нервной системы ЭНС развивается из клеток вагального и сакрального участков нервного гребня (Gershon M., 2002). Недифференцированные предшественники большей части энтеральных нейронов и глиальных клеток мигрируют вдоль блуждающего нерва, они колонизируют кишечную стенку в анальном направлении (рис. 1). При этом дифференцирующиеся нейробласты формируют ганглии миентерального сплетения, а недифференцированные клетки продолжают миграцию (Young H. et al., 1998). Часть вагальных нейробластов, колонизирующих толстую кишку, мигрирует из тонкой кишки по брыжейке (Obermaier O. et al., 2013). Одновременно с вагальными нейробластами из люмбо-сакрального и туловищного участка нервного гребня колонизируют терминальные отделы толстой и прямой кишки (Kapur R., 2000; Furness J., 2006).

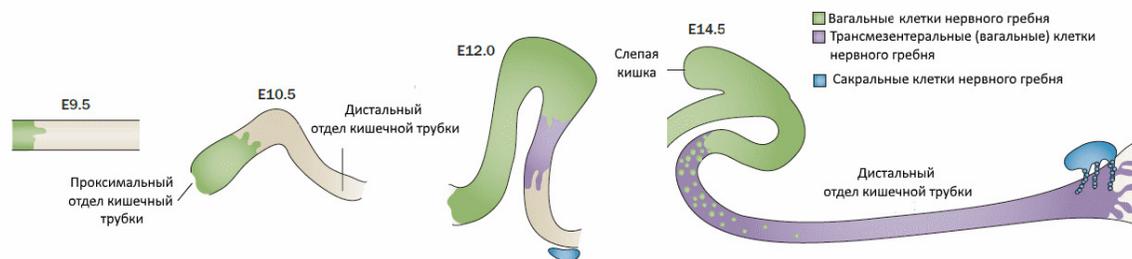


Рис. 1. Схематическое отображение развития ЭНС у мыши по O. Obermaier et al. (2013)

У мышей колонизация нейробластами ЖКТ происходит между 9.5 и 14.5-ыми сутками внутриутробного развития, а синапсы появляются на 18-ые сутки (Young H. et al., 1998). У человека нейробласты начинают мигрировать в ЖКТ на 4 неделе внутриутробного развития, миентеральное сплетение тонкой кишки выявляется на 8-9 неделе, а на 12-14 неделе общий план строения ЭНС уже соответствует таковому у взрослых (Wallace A., Burns A., 2005).

Субмукозное сплетение образуется путем миграции нейробластов из миентерального сплетения в подслизистый слой. У эмбрионов мыши через 2-3 дня после образования миентерального сплетения на соответствующем уровне кишечной трубки происходит формирование субмукозного сплетения (Wallace A., Burns A., 2005). Нервное сплетение поджелудочной железы, желчевыводящих протоков, желчного пузыря формируется аналогично путем миграции нейробластов из миентерального сплетения тонкого кишечника (Jiang Y. et al., 2003). По сравнению с нейронами дифференцировка глиальных клеток в ЭНС происходит в более поздние сроки (Gulbransen B. et al., 2014).

Морфологическая характеристика энтеральной нервной системы в норме

ЭНС состоит из интрамуральных ганглиев, содержащих нервные и глиальные клетки, и нервных отростков, связывающих ганглии между собой и с другими структурами полых органов ЖКТ. Она представлена двумя крупными нервными сплетениями — миентеральным (межмышечным) и субмукозным (подслизистым). Общий план строения ЭНС консервативен не только у млекопитающих, но и у всех позвоночных (Furness J. et al., 2017). Схема ЭНС представлена на рисунке 2. Миентеральное нервное сплетение располагается между продольным и циркулярным слоями мышечной оболочки на протяжении всей длины ЖКТ. Оно представлено ганглиями, соединяющими их нервными трактами и нервными отростками (рис. 3), при этом нейроны в ганглиях располагаются в одной плоскости (Hanani M. et al., 1998; Ross M., Pawlina W., 2016).

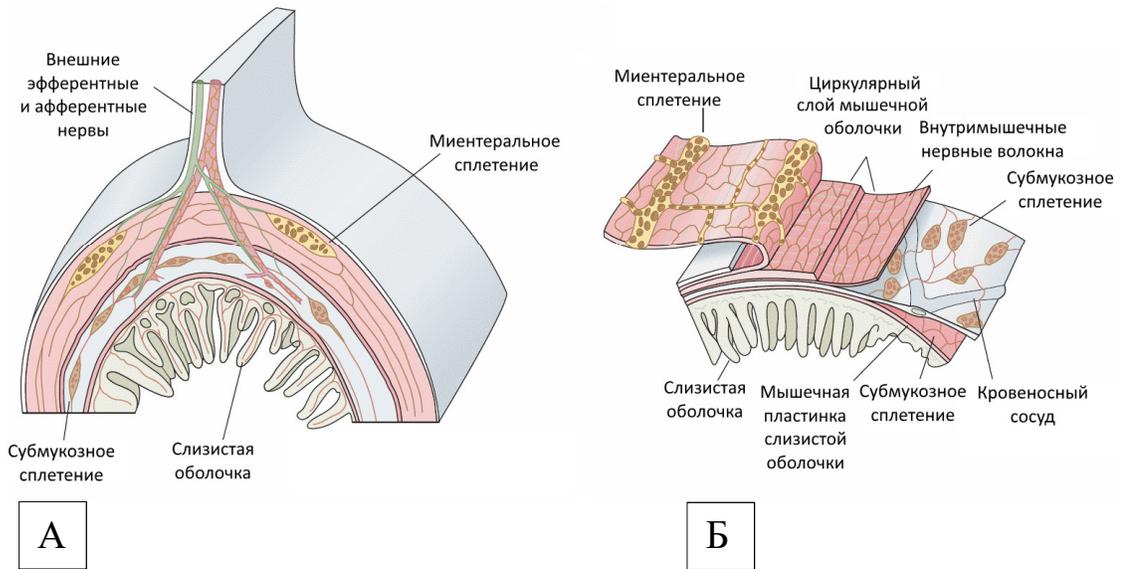


Рис. 2. Схема строения энтеральной нервной системе кишки по E. Kandel et al., (2013). А- поперечный срез стенки кишки; Б – послойное строение стенки кишки

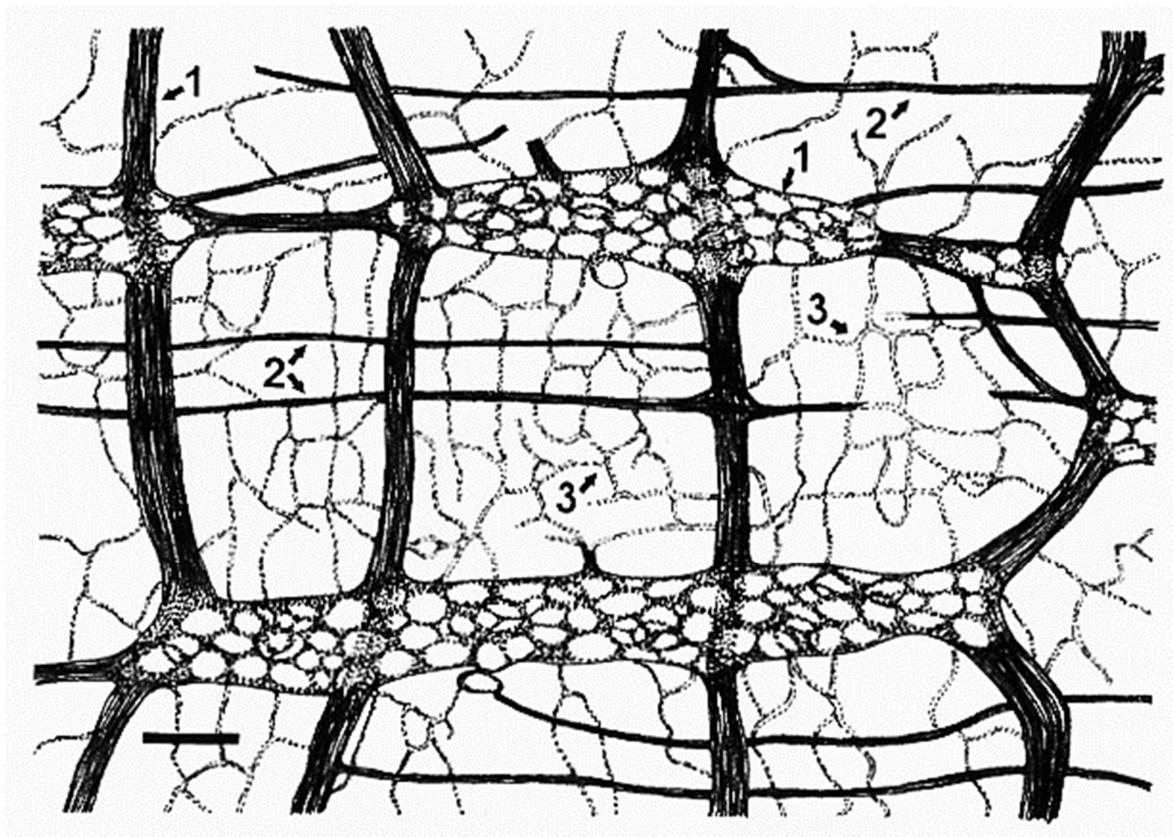


Рис. 3. Миентеральные ганглии и нервные тракты (1), нервные волокна средней толщины (2) и тонкие нервные волокна (3) по J. Furness (2006)

Субмукозное сплетение расположено преимущественно в подслизистой основе и отдельные ганглии субмукозного сплетения могут быть расположены в СПСО (Valemba O. et al., 1998). Размеры субмукозных ганглиев и длина субмукозных нервных волокон меньше, чем миентеральных (Timmermans J. et al., 2001). У мелких животных подслизистое сплетение образовано одним слоем ганглиев, у более крупных животных - двумя (Timmermans J. et al., 2001), а у человека - тремя (Ibba-Manneschi L. et al., 1995; Timmermans J. et al., 1997).

ЭНС имеет региональные отличия, касающиеся, в основном, соотношения количества ганглиев миентерального и субмукозного сплетений. Миентеральное сплетение представлено по всей длине ЖКТ (Furness J., 2006). Субмукозное сплетение хорошо развито в тонкой и толстой кишке, но у мелких животных отсутствует в пищеводе и желудке, а в желудке у крупных представлено лишь отдельными ганглиями (Izumi N. et al., 2002; Colpaert E. et al., 2002). В стенках желчевыводящих протоков и желчного пузыря ЭНС представлена хорошо выраженным миентеральным сплетением (Mawe G., Gershon M.D., 1989). В поджелудочной железе ЭНС образована ганглиями, локализованными в междольковой соединительной ткани и между ацинусами (Watari N., 1968).

Количество нейронов в ЭНС коррелирует с размерами животного, и, в зависимости от вида, их насчитывается от 2 до 1000 млн. (Gabella G., 1987; Karaosmanoglu T. et al., 1996). По косвенным расчетам у человека общее количество нейронов составляет 200-600 миллионов (Furness J., 2006), и оно сопоставимо с таковым в спинном мозге (Furness J., Costa M., 1980).

На уровне световой микроскопии энтеральные ганглии представляют собой компактные структуры, четко отграниченные от окружающих тканей и состоящие из тел нейронов, ядер глиальных клеток и плотного нейропилия. На ультраструктурном уровне энтеральные ганглии образованы телами нейронов, окруженными плотно упакованными аксонами, дендритами и глиальными клетками, и содержат небольшое количество межклеточного вещества. Внутри ганглиев соединительная ткань и кровеносные сосуды отсутствуют. Граница ганглиев образована многочисленными отростками глиоцитов (Gabella G., 1982; Furness J., 2006). Нервные волокна ЭНС безмякотные, большая часть поверхности аксонов в них покрыта отростками глиальных клеток, но в некоторых участках аксоны отделены от окружающей ткани лишь базальной пластинкой, состоящей из коллагеновых волокон. В данных участках аксоны энтеральных нейронов образуют «синапсы на расстоянии» - *synapse á distance*, из которых нейромедиаторы попадают в межклеточное вещество (Pavelka M., Roth J. 2005).

Энтеральные ганглии имеют ряд морфологических и функциональных особенностей по сравнению с другими вегетативными ганглиями (Wood J., 2011):

1. ЭНС выполняет комплексные интегративные функции, она может получать сенсорную информацию, обрабатывать ее и осуществлять эффекторную реакцию без участия вышестоящих нервных центров;
2. В ЭНС образуется большее количество различных низкомолекулярных веществ и пептидов, многие из которых являются нейромедиаторами ЦНС;
3. В отличие от других вегетативных ганглиев энтеральные ганглии не содержат соединительной ткани и кровеносных сосудов (Gabella G., 1982). Подобно гематоэнцефалическому энтеральные ганглии отграничены от окружающих тканей барьером (Wood J., 2011). Он недостаточно изучен, и с его существованием согласны не все исследователи (Furness J., 2006)
4. Глиальные клетки энтеральных ганглиев сходны по морфологии, клеточным маркерам, а также по функции с астроцитами ЦНС (Furness J., 2006; Gulbransen B. et al., 2014).

Большинство нейронов ЭНС по морфологии сомы и отростков относится к двум морфологическим типам: Догель-1 и Догель-2 (Brehmer A. et al., 1999; Wood J., 2011). Русским морфологом А. С. Догелем были описаны три типа нейронов в ЭНС различных животных и человека (Dogiel A., 1899, цитирование по Furness J., 2006). Догель-1 нейроны имеют множество отходящих от тела нейрона коротких отростков, являющихся дендритами, и один длинный отросток – аксон, разветвляющийся в гладкой мускулатуре, что придает Догель-1 нейронам вытянутые, звездчатые очертания (рис. 4). Догель-1 нейроны отличаются сравнительно длинной проекцией аксонов и функционируют как эфферентные или интернейроны (вставочные нейроны). Большинство моторных и секреторно-моторных нейронов относится к этому типу (Хауликэ И., 1978; Furness J., 2006; Wood J., 2011). Догель-2 нейроны имеют округлую или овальную форму, более гладкие очертания чем Догель-1 нейроны и 3-10 длинных и коротких отростков, разветвляющихся на расстоянии от тела нейрона (рис. 4). Догель-2 нейроны чаще являются афферентными, но могут быть и интернейронами (Хауликэ И., 1978; Furness J., 2006; Wood J., 2011). Догель-3 нейроны отличаются наличием 2 - 10 коротких дендритов с многочисленными разветвлениями. Догель-3 нейроны обнаружены у морских свинок и свиней (Timmermans J. et al., 1993; Lomax A. et al., 1999).

Также другими авторами описаны другие типы энтеральных нейронов, названные по аналогии с первыми тремя Догель-4, Догель-5, Догель-6, Догель-7 (Brehmer A. et al., 2002; Wood J., 2011). В составе миентеральных ганглиев так же выявляются мини-нейроны и гигантские нейроны. Они обнаруживаются в ЭНС у человека и крупных животных - свиньи, собаки (Brehmer A. et al., 2004). При ультраструктурном исследовании энтеральных ганглиев характерные особенности имеются только у Догель-2 нейронов, в них обнаруживается большое количество митохондрий (Pompolo S., Furness J., 1988). Хотя общий план строения ЭНС млекопитающих одинаков, в зависимости от вида животного отмечаются особенности регионального распределения ганглиев, нейронов в них, а также нейрохимических свойств нейронов (Furness J., 2006).

Помимо собственных энтеральных ганглиев и их отростков ЖКТ имеет богатую иннервацию афферентными, в том числе ноцицептивными и эфферентными волокнами симпатической и парасимпатической нервной системы. Симпатическая нервная система иннервирует кишечник через систему чревных нервов, а парасимпатическая - через блуждающий и тазовые внутренностные нервы. Волокна тазовых и блуждающего нервов выявляются на уровне миентерального сплетения (McRorie J. et al., 1991; Wang F., Powley T., 2000). Брыжеечные волокна, содержащие симпатические аксоны, сопровождают небольшие артерии и ветвятся по их ходу (Furness J., 2006). Рецепторные поля афферентных волокон включают серозную оболочку, брыжейку, мышечную и слизистую оболочку. Часть афферентных волокон иннервируют одновременно и мышечную и слизистую оболочку (Brookes S. et al., 2016). Афферентные волокна могут быть высоко- и низкопороговыми механорецепторами, находящимися как в миентеральном, так и подслизистом сплетении и хеморецепторами, чувствительными, например, к серотонину. Большинство висцеральных чувствительных волокон являются полимодальными, а высокопороговые механорецепторы могут отвечать и за ноцицептивную рецепцию органов ЖКТ (Bielefeldt K., Gebhart G., 2004). Часть

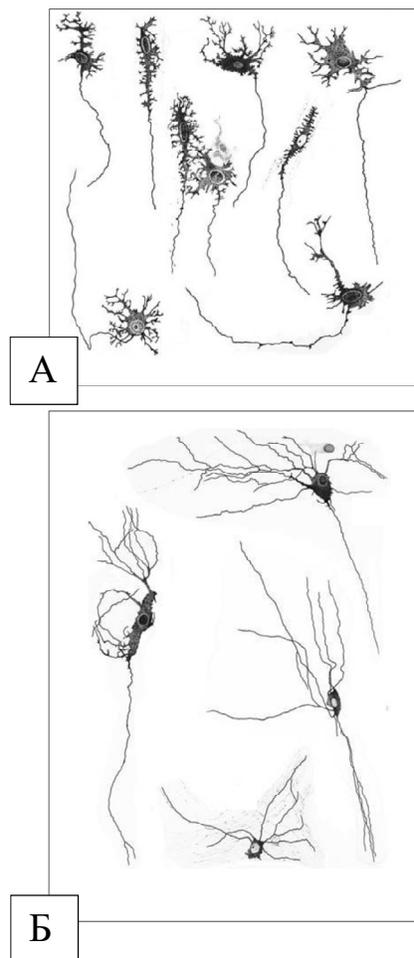


Рис. 4. Нейроны Догель-1 (А) и Догель-2 (Б) типа по J. Furness (2006)

афферентных волокон являются «молчащими», не реагирующими на воздействия в норме, но их активность повышается при патологических процессах, например, воспалении (Feng B. et al., 2012). С ЭНС тесно ассоциированы пейсмейкерные клетки Кахаля, тучные, энтероэндокринные и иммунокомпетентные клетки (Ward S. et al., 2000; Genton L., Kudsk K., 2003; Furness J., 2006; Wood J., 2011).

Морфологическая характеристика глиальных клеток энтеральной нервной системы

Помимо нейронов не менее значимым клеточным компонентом ЭНС являются глиальные клетки, которые отличаются по морфологии и маркерам и от макроглии центральной нервной системы и от швановских клеток периферической нервной системы. Морфология и функция энтеральных глиальных клеток подробно описаны в монографии В. Gulbransen et al. (2014). Подобно макроглии ЦНС они образуются из общего с нейронами клеточного предшественника, берущего начало из нервного гребня (Furness J., 2006).

Морфологически глиальные клетки имеют значительно меньший, чем нейроны размер тела клетки и ядра, которое занимает большую часть тела клетки. Специфическим маркером глиальных клеток ЭНС в эмбриогенезе является виментин, а в зрелом возрасте – GFAP, S100b, Sox10, последний характерен как для зрелых, так и незрелых энтеральных глиальных клеток (Gulbransen B., Brown I., 2014; Grubišić V., Gulbransen B., 2017). В составе ЭНС можно выделить четыре субпопуляций глиальных клеток в зависимости от их морфологической характеристики и расположения относительно слоев кишечной стенки (Grubišić V., Gulbransen B., 2017). Это глия, расположенная в ганглиях и нервных трактах – внутриганглионарная (протоплазматическая) и межганглионарная (фиброзная), и глия, располагающаяся вне ганглиев и нервных трактов- внутримышечная и мукозальная. Внутриганглионарная глия сходна по морфологии с плазматическими астроцитами ЦНС, и она располагается в пределах миентеральных и субмукозных ганглиев. Ее отростки тесно контактируют с нейронами и участвуют в формировании нейропиля. Межганглионарная глия сходна с фиброзными астроцитами ЦНС, и она локализована в нервных трактах. Межмышечные глиальные клетки ассоциированы с нервными волокнами в толще мышечной оболочки. Мукозальная нейроглия сопровождает нервные волокна в слизистой оболочке. Разные популяции нейроглии различаются между собой по морфологии, функции, а также уровню экспрессии глиальных маркеров. Глиальных клеток больше или их количество равно числу нейронов в миентеральных ганглиях, но их меньше в субмукозных. Размеры глиальных клеток не зависят от размера животного, но количество глиальных клеток в составе ЭНС выше у крупных животных (Gulbransen B., Brown I., 2014).

Энтеральные прогениторные клетки энтеральной нервной системы

Третьим клеточным компонентом ЭНС являются, по мнению ряда авторов, энтеральные прогениторные клетки (Gershon M., 2011). Они обнаружены у человека (Azan G. et al., 2011) и мышей (Silva A. et al., 2008) и характеризуются экспрессией маркера Sox10 (Laranjeira C., 2010). В системе *in vitro* они способны к образованию нейросфероподобных телец, пролиферации и дифференцировке в клетки с фенотипом нейронов и глии. Часть авторов считает, что прогениторные клетки ЭНС образуются путем дедифференцировки энтеральной глии, которая может сохранять нейрогенный потенциал и после дифференцировки (Laranjeira C., 2010; Laranjeira C. et al., 2011). У взрослых животных эти клетки способны к глиогенезу (Joseph N. et al., 2011) и, возможно, нейрогенезу (Laranjeira C. et al., 2011; Kulkarni S. et al., 2017).

Функциональная и электрофизиологическая характеристика нейронов энтеральной нервной системы

Для нейронов ЭНС характерна морфофункциональная гетерогенность (Фоканова О.А., Румянцева Т.А., 2006). Подобно нейронам ЦНС среди энтеральных нейронов, располагающихся в энтеральных ганглиях, выявляется три основных функциональных типа: афферентные, эфферентные и интернейроны (вставочные нейроны), которые необходимы для автономного функционирования ЭНС (Wood J., 2011; Kandel E. et al., 2012). Афферентные нейроны выполняют сенсорную функцию. К ним относятся собственные первичные афферентные нейроны (intrinsic primary afferent neurons), которые, в отличие от внешних афферентных, находятся в составе ЭНС и имеют преимущественно Догель-2 морфологический тип (Furness J., 2006). Интернейроны выполняют интегративные функции, получают сенсорную информацию от афферентных нейронов и регулируют активность эфферентных нейронов. Эфферентные нейроны являются моторными или секретомоторными и могут быть как возбуждающими, так и тормозными. Они относятся преимущественно к Догель-1 морфологическому типу.

По электрофизиологической характеристике энтеральные нейроны разделяются на два типа — АН-тип (after hyperpolarisation) – со следовой гиперполяризацией и S-тип (synaptic) — синаптические (Furness J., 2006; Wood J., 2011). Отличительной характеристикой АН-типа нейронов являются более положительный, чем у S-типа потенциал покоя, низкая возбудимость, продолжительная следовая гиперполяризация после потенциала действия (Furness J., 2006; Wood J., 2011). АН-тип нейронов наиболее часто имеет Догель-2 морфологический тип (Wood J., 2011). Для S-типа нейронов характерен более отрицательный по сравнению с АН-типом потенциал покоя, короткий потенциал действия с последующей

быстрой гиперполяризацией. S-тип нейронов чаще имеет Догель-1 морфологический тип (Wood J., 2011). Отсутствие мягкотных волокон в ЭНС указывает на небольшую скорость проведения нервного импульса (Furness J., 2006).

Собственные афферентные нейроны получают и передают информацию о состоянии тканей и содержимом просвета кишки. Они способны к механо-, хемо- и ноцицепции, являясь полимодальными рецепторными нейронами (Kunze W. et al., 2000; Furness J., 2006). Они тесно взаимодействуют с энтероэндокринными клетками, клетками иммунной системы и между собой (Kunze W., 1999; Furness J., 2006), связаны друг с другом синапсами и образуют функциональную сеть (Furness J., 2006). Первичные афферентные нейроны составляют около 20% всех нейронов ЭНС у человека, для них характерен Догель-2 морфологический и АН-нейрофизиологический тип (Furness J., 2006).

Помимо собственных афферентных нейронов органы ЖКТ иннервируются внешними афферентными нейронами, тела которых располагаются в ЦНС. В отдельную группу входят интестино-фугальные нейроны, расположенные в миентеральном сплетении. Их аксоны проецируются не на структуры ЖКТ, а на превертебральные симпатические ганглии (Szurszewski J., 1994; Furness J., 2006, 2016).

Интернейроны отличаются большой региональной изменчивостью (Furness J., 2006). Выделяют несколько их классов: восходящие, нисходящие и связывающие миентеральное и субмукозное сплетения интернейроны. В составе миентерального сплетения их связи формируют цепи, которые идут в оральном и анальном направлении (Young H., Furness J., 1995). Вероятно, подобно собственным первичным афферентным нейронам интернейроны выполняют рецепторную функцию, так как способны к механорецепции (Smith T. et al., 2007).

Эфферентные нейроны включают возбуждающие и тормозные мотонейроны, иннервирующие продольный, циркулярный мышечные слои и мышечную пластинку слизистой оболочки. Это нейроны с S-нейрофизиологическим типом, они располагаются преимущественно в миентеральном сплетении (Furness J., 2006). К эфферентным нейронам так же относятся секретомоторные, секретомоторно-вазодилаторные нейроны и нейроны, взаимодействующие с энтероэндокринными клетками. Эти нейроны контролируют процессы всасывания и секреции в слизистой оболочке и локальный гомеостаз (Ekblad E. et al., 1991; Furness J., 2006). Они располагаются преимущественно в подслизистом сплетении кишечника и миентеральном сплетении желудка (Furness J., 2006). Клетки локальной иммунной системы несут на своей поверхности рецепторы к нейромедиаторам (Renzi D. et al., 2000), а тучные клетки слизистой оболочки располагаются вблизи аксонов (Stead R. et al., 1989), что косвенно указывает на их взаимодействие с эффекторным звеном ЭНС.

Многие вещества, являющиеся нейромедиаторами в ЦНС, могут выполнять аналогичную функцию в ЭНС (McConalogue K., Furness J., 1994). Для каждого нейрона характерен основной нейромедиатор, комедиатор и модулирующий трансмиттер (нейромодулятор), действующий на пресинаптическом уровне (Furness J., 2006). Не все вещества, выявленные в ЭНС и являющиеся нейромедиаторами в ЦНС, соответствуют критериям нейромедиаторов в ЭНС у разных видов млекопитающих. Так, серотонин имеет все критерии нейромедиатора в ЭНС у морских свинок, но у человека и мыши его роль как нейромедиатора не доказана (Spencer N., Keating D., 2016).

Собственные афферентные нейроны являются холинергическими, в качестве комедиаторов в них обнаруживаются тахикинины, такие как субстанция P, и у многих видов животных CGRP - Calcitonin Gene Related Peptide, пептид, связанный с геном кальцитонина (Furness J., 2006). Они функционально тесно связаны с энтероэндокринными клетками (ЕС-клетки), самой многочисленной клеточной популяцией диффузной эндокринной системы. Основным медиатором взаимодействия ЕС-клеток и собственных первичных афферентных нейронов - серотонин (Kirchgeessner A. et al., 1992; Pan H., Gershon M. , 2000).

Возбуждающими нейромедиаторами для интернейронов ЭНС являются ацетилхолин, АТФ, и, вероятно, серотонин, тахикинины, CGRP и другие нейромедиаторы, тормозными - норадреналин, соматостатин и, возможно, серотонин (Furness J., 2006). Основным возбуждающим медиатором мотонейронов является ацетилхолин, комедиаторами – тахикинины, такие как субстанция P, нейрокинин А (Furness J., 2006) и АТФ (Zagorodnyuk V., Maggi C., 1998). Возбуждающие мотонейроны также выделяют трансмиттеры, оказывающие модулирующий эффект на выброс возбуждающих нейромедиаторов - ГАМК (гамма-аминомасляная кислота), эндогенные опиоиды, ацетилхолин (Furness J., 2006).

Тормозные мотонейроны характеризуются такими нейромедиаторами как АТФ, VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide - вазоактивный интестинальный пептид), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide - гипофизарный пептид-активатор аденилатциклазы) и другими (Rand M., 1992; Makhlouf G. et al., 1993; Furness J., 2006). В отдельную группу входят так называемые газотрансмиттеры - низкомолекулярные вещества, которые не накапливаются в пресинаптической области аксона в виде синаптических везикул, и поэтому они не относятся к классическим нейротрансмиттерам, но способны оказывать эффект на гладкомышечные клетки мышечной оболочки и стенки кровеносных сосудов, нейроны и другие клетки. К ним относятся NO (монооксид азота), CO (монооксид углерода) и в последние годы H₂S (сероводород), они оказывают преимущественно тормозный эффект (Xue L. et al., 2000; Kasperek M. et al., 2012). NO широко представлен в ЭНС и является важным тормозным

нейромедиатором (Huizinga J., 2016). Количество нитрергических нейронов различается в разных отделах ЖКТ (Шилкин В.В. и др., 2004).

Секретомоторные и вазодилаторные нейроны в качестве нейромедиаторов используют ацетилхолин и VIP, что позволяет различить холинергические и нехолинергические секретомоторные нейроны (Furness J., 2006). Гистамин, интерлейкин-1-бета и фактор активации тромбоцитов рассматриваются как возможные медиаторы, осуществляющие взаимодействие между ЭНС и иммунной системой ЖКТ (Wood J., 2011).

Важную роль в функционировании ЭНС играют глиальные клетки, образующие контакты с нейронами и друг с другом. Кальциевые волны, проходящие через сеть глиальных клеток, является дополнительной коммуникативной системой ЭНС и выполняет, вероятно, модулирующую функцию. Глиальные клетки необходимы для поддержания эпителиального барьера, а внутриганглионарные глиальные клетки принимают активное участие в трофике нейронов и обмене нейромедиаторов (Gulbransen B., Brown I., 2014). Субэпителиальные глиальные клетки контактируют с эпителиоцитами, кровеносными и лимфатическими капиллярами и энтероэндокринными клетками, ряд авторов предполагает, что мукозальные глиальные клетки и нейроны субмукозного сплетения формируют нейро-глио-эпителиальные функциональные единицы (Neunlist M. et al., 2013).

Рефлексы энтеральной нервной системы

Многообразие типов нейронов и их связей позволяет энтеральной нервной системе реализовывать сложные рефлекторные акты. ЭНС содержит “библиотеку программ“ для множества физиологических реакций тонкой и толстой кишки (Wood J., 2011, 2016). Многие из них не требуют афферентного стимула, что позволяет отнести их к центральным генераторам упорядоченной активности - central pattern generator (Wood J., 2011). Выделяют рефлексы, которые могут реализовываться самой ЭНС, что отражает ее автономность, и рефлексы, в реализации которых участвует симпатическая и парасимпатическая нервная система (Furness J., 2006).

В рефлекторной деятельности ЖКТ можно выделить миогенный и нейрогенный компоненты. Миогенный компонент не требует функционирования ЭНС, так как гладкие миоциты ЖКТ совершают спонтанные ритмические сокращения. При этом регистрируется электрическая активность - медленные волны, проходящие по гладким миоцитам в анальном направлении. Благодаря наличию между гладкими миоцитами, как и в кардиомиоцитах, щелевых контактов, медленные волны распространяются по мышечной оболочке (Wood J., 2011). Источником и координатором медленных волн являются интерстициальные клетки Кахала (Horiguchi K. et al., 2001; Sanders K., Ward S., 2006; Furness J., 2006). Медленные волны

постоянно генерируются клетками Кахаля, но в тонкой и толстой кишке они не достигают необходимого уровня для развития потенциала действия у гладких миоцитов. Возбуждающие мотонейроны снижают поляризацию плазматической мембраны клеток Кахаля и миоцитов, облегчая тем самым возникновение потенциала действия и сокращения миоцитов при прохождении медленных волн. Тормозные мотонейроны повышают поляризацию с противоположным эффектом.

По тому же механизму возникает спонтанная двигательная активность мышечной пластинки слизистой оболочки, которая получает возбуждающую и тормозную иннервацию от ЭНС (Morgan K. et al., 1985). В ЖКТ координированная функциональная активность ЭНС и мышечной оболочки достигается сбалансированным соотношением интенсивности и продолжительности активности возбуждающих и тормозных нейронов ЭНС (Wood J., 2011).

Для тонкой кишки характерны следующие виды рефлекторной двигательной деятельности: перемешивание, пропульсивный или перистальтический рефлекс, мигрирующий миоэлектрический комплекс, ретропульсия, так называемый физиологический илеус и другие (Furness J., 2006; Wood J., 2011).

Перистальтический рефлекс, являющийся базовым полисинаптическим рефлексом кишки, был впервые описан W. Bayliss и E. Starling (1899). Этот рефлекс возникает при наличии болюса (пищевого комка) в просвете кишечника. При этом проксимальнее болюса инициируется восходящий возбуждающий рефлекс, приводящий к сокращению циркулярного слоя мышечной оболочки, а дистальнее болюса, нисходящий тормозной рефлекс, приводящий к расслаблению циркулярного и сокращению продольного мышечного слоя мышечной оболочки, за счет чего болюс проталкивается в анальном направлении (Wood J., 2011). Перистальтический рефлекс, при котором пищевой болюс движется в оральном направлении, является частью рвотного рефлекса, который также включает в себя изменение моторной активности желудка, пищевода и сокращение диафрагмы и мышц брюшного пресса (Horn C., 2008; Wood J., 2014). У грызунов рвотный рефлекс отсутствует (Horn C. et al., 2013).

Физиологический илеус — состояние физиологического отсутствия моторной деятельности в тонкой и толстой кишке. Его вариантом является атония мускулатуры кишечника вне зоны перистальтики. Для расслабления мускулатуры кишечника требуется активность тормозных нейронов ЭНС (Wood J., 2011, 2016).

Для тонкой кишки человека и хищных животных характерны два паттерна двигательной активности — при приеме пищи и в промежутке между приемами пищи. Период между приемами пищи состоит из чередования 4-х фаз: покоя или физиологического илеуса, нерегулярной активности, мигрирующего миоэлектрического комплекса, короткой

нерегулярной активности (Carlson G. et al., 1972; Furness J., 2006). Мигрирующий миоэлектрический комплекс представляет собой цепь последовательно возникающих и затухающих перистальтических сокращений, распространяющихся на небольшое расстояние. Область возникновения очередного перистальтического сокращения каждый раз возникает чуть дистальнее предыдущего. Таким образом, формируется фронт сокращений, который проходит через весь тонкий кишечник. Фаза нерегулярной активности между приемами пищи и моторная активность при приеме пищи проявляется в виде нерегулярной перистальтики. При этом наблюдаются стационарные сокращения, при которых кишечное содержимое перемешивается, и нестационарные, при которых оно перемещается на различное расстояние в анальном направлении (Dusdieker N., Summers R., 1980; Furness J., 2006)

Кроме вышеуказанных рефлексов существуют чрезвычайно быстрое гигантское мигрирующее сокращение, напоминающее мигрирующий миоэлектрический комплекс (Sarna S., 1987) и ретропульсии. Эти реакции возникают при раздражении слизистой оболочки, наличии энтеропаразитов, аллергической реакции или ионизирующем излучении. (Furness J., 2006; Wood J., 2011).

Другим базовым рефлексом является секретомоторный рефлекс. Он регулирует соотношение процессов всасывания и секреции слизистой оболочки, усиливая всасывание питательных веществ при их наличии в составе пищевого комка и секрецию при контакте с токсинами (Furness J., 2006).

Толстый кишечник имеет сходную с тонким моторную активность. Большую часть времени толстый кишечник совершает перемешивающие и пропульсивные движения, что обеспечивает абсорбцию жидкости и формирование твердых каловых масс. Периодически совершаются направленные перистальтические движения, которые продвигают каловые массы в дистальном направлении. Пропульсивные движения толстого кишечника могут быть разделены на два типа: так называемые высокоамплитудные сокращения (high-amplitude propagated contractions), которые перемещают твердое содержимое толстого кишечника в анальном направлении и инициируют акт дефекации, и низкоамплитудные сокращения (low-amplitude propagated contractions), продвигающие газообразное и жидкое содержимое толстого кишечника (Bassotti G. et al., 2014). Моторная активность толстой кишки важна не только для продвижения кишечного содержимого в анальном направлении, но и для его накопления - у пациентов с заболеваниями кишечника диарея часто сочетается со снижением моторной активности сигмовидной кишки (Dinning P. et al., 2016). При растяжении ампулы прямой кишки инициируется рефлекс дефекации, связанный как с ЭНС, так и ЦНС (Bassotti G. et al., 2014). Рефлекторная деятельность толстого кишечника имеет выраженную циркадную

активность с пиками в дневные часы, после пробуждения и употребления пищи (Bassotti G. et al., 2014). Для толстого кишечника не характерен мигрирующий миоэлектрический комплекс (Furness J., 2006).

Интегративное управление ЖКТ, например, координирование работы сфинктеров, разных отделов ЖКТ и его реакции на внешние стимулы осуществляется симпатической и парасимпатической нервной системой. Симпатическая и парасимпатическая иннервация наиболее выражена в области сфинктеров (Howard E., 1973). К рефлексам, связанным с симпатической нервной системой, относятся симпатический энтероэнтеральный регуляторный, симпатический энтерогастральный, генерализованный симпатический тормозный рефлекс и другие (Furness J., 2006). Норадренергические нейроны симпатической нервной системы подавляют двигательную и секреторную активность ЖКТ опосредованно, воздействуя на возбуждающие холинергические нейроны ЭНС (Jansson G. et al., 1969; Furness J., 2006). К рефлексам, связанным с блуждающим нервом, относятся интестино-интестинальный рефлекс, который включает в себя гастроколический и другие рефлексы, обеспечивающие изменение моторики кишечника при поступлении пищи в желудок (Costa M., Furness J., 1982; Furness J. 2006).

Морфологические методы изучения энтеральной нервной системы

Классический метод окрашивания гематоксилином и эозином позволяет выявить энтеральные ганглии и клетки в них. Однако при оценке препаратов, окрашенных данным методом, невозможна визуализация отростков нейронов и глиальных клеток.

Исторически первыми методами морфологического изучения ЭНС были методы гистологического окрашивания такими красителями, как толуидиновый синий и другими и методы серебрения (Furness J., 2006). Несмотря на важную роль, которую эти методы сыграли в описании нормальной гистоморфологии ЭНС, в настоящее время они имеют ограниченное применение (Knowles C. et al., 2009). Главным недостатком серебрения является слабо избирательное и случайное окрашивание нервных структур и структур соединительной ткани, при этом окрашивается лишь малая часть нейронов (Highley J., Sullivan N., 2013). Электронная микроскопия широко применяется для изучения ультраструктуры ЭНС, но ее использование ограничено небольшим размером поля зрения и трудностью морфометрического анализа. Гистохимические методы, такие как выявление NADPH-диафоразы, активно применялись для изучения ЭНС в прошлом, но сейчас они вытесняются иными методами. В настоящее время ИГХ и ИФ методы стали основными для изучения ЭНС. В первом случае для визуализации используется химическая реакция хромогена с образованием нерастворимого продукта реакции, во втором – флуоресцентная метка (Jackson P., Blythe D., 2013). Из-за сложной

гистоархитектоники ЭНС на гистологических срезах кишки трудно с высокой точностью охарактеризовать ее строение и изменения, поэтому в дополнение к ним ЭНС изучается на тотальных препаратах кишки, преимущественно с использованием флуоресцентной микроскопии. Применение конфокальной микроскопии позволяет создавать трехмерные реконструкции структур ЭНС, меченных флуоресцентной меткой.

Основные ИГХ и ИФ маркеры нервной системы, применяемые в настоящее время, приведены в обзорной статье Р. Тапарат (2013).

Маркеры нейронов энтеральной нервной системы

NSE (Neuron Specific Enolase – нейронспецифическая эналаза) – исторически первый нейронспецифический маркер, использование которого, однако, ограничено из-за его экспрессии в клетках других типов, например, в глии.

PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5 - протеин продукт гена 9.5) – паннейрональный маркер, являющийся убиквитиновой гидролазой, локализованной в теле и отростках нейронов. Помимо нейронов его экспрессия отмечается в энтероэндокринных клетках, что может ограничивать его применение (Krammer H. et al., 1994).

β III-тубулин (β III-tubulin) – паннейрональный маркер, компонент нейронального цитоскелета, локализованный в телах и отростках нейронов. Он обладает строгой нейрональной специфичностью и позволяет визуализировать нервные отростки и тела нейронов.

HuC/D – нейронспецифичный маркер, относящийся к РНК связывающим протеинам семейства Hu. Он локализован в теле и, в меньшей степени, в ядре нейронов. Иммунореактивность и локализация данного маркера зависит от функционального состояния нейронов (Desmet A. et al., 2014).

Нестин (Nestin) – маркер нейробластов, экспрессирующийся в эмбриональном периоде в предшественниках нейронов.

NeuN (Fox-3) – пан-нейрональный маркер, имеет ядерную локализацию. Этот маркер экспрессирует большинство нейронов после окончания их дифференцировки.

Некоторые маркеры селективно маркируют субпопуляции нейронов – ацетилхолинэстераза (ChAT) выявляет тела холинергических нейронов, нейрон-специфическая NO-синтаза (nNOS) – тела и отростки нитергических нейронов.

Маркеры глиальных клеток энтеральной нервной системы

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein - кислый фибриллярный глиальный белок) - маркер, характерный для части глиальных клеток ЭНС, локализуется в их отростках. Его экспрессия повышается при функциональной активации нейроглии. Меньше половины всех глиальных клеток ЭНС являются GFAP-положительными (Grubišić V., Gulbransen B., 2017).

S100b – кальций-связывающий белок семейства белков S100, характерный преимущественно для глиальных клеток, в которых он локализуется преимущественно в цитоплазме. При активации глиальные клетки активно экспрессируют этот протеин и способны к его экзоцитозу. Большинство глиальных клеток ЭНС экспрессируют этот маркер (Grubišić V., Gulbransen B., 2017).

Sox10 (Neural Crest Transcription Factor - транскрипционный фактор нервного гребня) и виментин - маркеры, характерные как для зрелых, так и незрелых глиальных клеток. Sox10 локализован в ядре глиальных клеток.

Следует отметить, что в составе ЭНС часть глиальных клеток является отрицательными по GFAP или S100b, а часть негативна по обоим упомянутым маркерам. Уровень экспрессии этих маркеров может варьировать между глиальными клетками и повышаться при их активации (Gulbransen B., Brown I., 2014; Grubišić V., Gulbransen B., 2017).

1.2. Морфологические изменения энтеральной нервной системы при воспалительных заболеваниях кишечника

Функциональные нарушения и заболевания, при которых вовлекается ЭНС, можно условно разделить на несколько групп: нарушения развития ЭНС, такие как болезнь Гиршпрунга; острые и хронические заболевания ЖКТ, к которым относятся ВЗК; заболевания других органов и систем с ЖКТ; ятрогенные патологии (Furness J., 2006; Rao M., Gershon M., 2016). Изменения ЭНС могут быть как вторичными по отношению к заболеваниям желудочно-кишечного тракта, так и являться одной из причин их развития (Cirillo C., et al. 2011). Среди приобретенных заболеваний ЖКТ наибольшую клиническую значимость имеют ВЗК, такие как язвенный колит, болезнь Крона и синдром раздраженного кишечника (Ткачев А.В. и др., 2012). При этих заболеваниях наблюдается изменения ЭНС, характеризующиеся нарушениями сенсомоторной и секреторной функции ЖКТ (Lakhan E., Kirchgessner A., 2010). Публикации, посвященные исследованию ЭНС при язвенном колите у человека, ограничены небольшим числом работ и представленные в них данные фрагментарны и противоречивы (Geboes K., Collins S., 1998; Villanacci V. et al., 2008; Cirillo C. et al., 2011). Это связано со сложностью в получении тканевого материала, стандартизации пациентов по полу, возрасту, течению заболевания, лечению, невозможностью подбора адекватного контроля (Cirillo C. et

al., 2011). В связи с этим изменения ЭНС активно изучаются на экспериментальных моделях колита.

В литературе представлены работы, посвященные изучению изменений энтеральной нервной системы на моделях колита, индуцированного химическими веществами. Однако интерпретация и систематизация полученных результатов, затруднена из-за отсутствия стандартизации по таким параметрам как доза используемого вещества, продолжительность эксперимента, вид и пол экспериментальных животных и методики оценки изменений ЭНС.

Наибольшее число работ по изучению ЭНС проведено на моделях острого колита, индуцированного динитробензолсульфоновой или тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС и ДНБС). Морфологические изменения, выявляемые на этих моделях колита при исследовании ободочной кишки, в целом, сходны с таковыми при болезни Крона (Scheiffele F., Fuss I., 2002). Для воспроизведения колита используют раствор ТНБС или ДНБС в 30-50% этаноле, который вводят через катетер *per rectum* в тот или иной отдел кишки.

Другой распространенной в экспериментальных исследованиях моделью колита является язвенный колит, индуцированный декстрансульфатом натрия, эта модель была предложена Т. Ohkusa в 1985 году и подробно описана I. Okayasu et al. в 1990. Она позволяет вызвать острый или хронический колит различной степени тяжести за счет нарушения эпителиального барьера (Perše M., Cerar A., 2012).

Для индукции колита также используется заражение животных гельминтом *Trichnella Spiralis* (Aulí M., Fernández E., 2005). Кроме того, существуют модели спонтанного колита, например, у мышей, нокаутированных по генам ИЛ-10, ИЛ-2, Т-клеточному рецептору альфа или бета-3 (MacDonald T. et al., 1997; Scheinin T. et al., 2003), бактериальные модели (*Citrobacter rodentium*, *Salmonella typhimurium*) и модели адаптивного переноса (Morampudi V. et al., 2014).

Экспериментальная модель колита, индуцированного декстрансульфатом натрия

Модель колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (ДСН) широко применяется исследователями, колит воспроизводится практически у 100% животных, и по морфологическим проявлениям он, во-многом, соответствует язвенному колиту у человека. Для индукции колита используется водный раствор ДСН разной концентрации. Варьируя концентрацией, длительностью потребления и интервалами между потреблением ДСН можно индуцировать острый или хронический колит различной степени тяжести. Тяжесть индуцированного колита зависит от физико-химических свойств ДСН (молекулярная масса, степень сульфатированности), производителя, а также от вида, линии и пола

экспериментальных животных, их физиологического состояния и микробиоты кишечника (Perše M. et al., 2012).

Оптимальные результаты при индукции колита достигаются при применении ДСН с молекулярной массой 40 кДа. ДСН с высокой молекулярной массой (500 кДа) не вызывает развития колита у мышей, так как он не проникает через эпителиальный барьер (Kitajima S. et al., 2000). Потребление ДСН с малой молекулярной массой (5кДа) вызывает развитие ограниченного эрозивно-язвенного воспалительного процесса преимущественно в слепой кишке и проксимальном отделе ободочной (Kitajima S. et al., 2000).

Тяжесть язвенного колита, вызванного ДСН, зависит от линии животных, так С3Н/HeJ, NOD/Ltj и NOD-scid линии высоко-, а SvPas и DBA/2J линии мышей низкочувствительны к ДСН. Линия С3Н мышей более чувствительна к ДСН по сравнению с СВА/Н и BALB/с мышами. ДСН вызывает у мышей С57В1/6 хронический колит, а у BALB/с воспалительный процесс не хронизируется (Melgar S. et al., 2005).

В инициации воспалительных изменений ободочной кишки при ДСН-индуцированном колите играет роль, главным образом, воздействие ДСН на эпителиальную выстилку толстой кишки за счет разрушения водородных связей муцинов, альтерации плотных контактов между эпителиоцитами и последующей транслокацией просветной микрофлоры (Mennigen R. et al., 2009) и развитием инфекционно-воспалительного процесса с увеличением продукции провоспалительных цитокинов - ФНО- α , ИЛ-1 β , ИНФ- γ , ИЛ-10, и ИЛ-12 (Poritz L. et al., 2007; Perše M. et al., 2012; Абдулаева С.О., 2012).

Морфологические изменения энтеральной нервной системы при колите, индуцированном декстрансульфатом натрия

Морфологические изменения ЭНС при ДСН-индуцированном колите описаны лишь в 8-х работах.

Mizuta Y. et al. (2000) для индукции колита у крыс применяли 5% раствор ДСН в течение 5 дней. По данным авторов количество PGP 9.5- и nNOS-положительных нейронов в дистальном отделе при остром колите не отличалось от контроля.

Joseph N. et al. (2011) моделировали хронический колит у мышей заменой питьевой воды на ДСН на 6 недель и выведением животных на 8 неделю эксперимента. В работе не указана концентрация ДСН и пол животных. Авторы использовали бромдезоксисуридин (BrdU) в сочетании с антителами к HuD и S100b для выявления пролиферации клеток. При хроническом воспалении был выявлен глиогенез, но не нейрогенез.

В работе V. Gulbransen et al. (2012) для индукции острого язвенного колита был использован 3% раствор ДСН, который самцы мышей С57В1/6 потребляли в течение 8 дней.

Авторы не приводят данные о клинических и морфологических проявлениях индуцированного острого колита. Оценку изменений проводили на тотальных препаратах мышечной оболочки ободочной кишки. Для выявления нейронов миентерального нервного сплетения авторы использовали антитела к паннейрональному маркеру HuC/D и глиальному маркеру GFAP. У животных с острым язвенным колитом было выявлено статистически значимое снижение количества миентеральных нейронов в ганглиях.

J. Winston et al. (2013) воспроизвели модель острого колита у самцов крыс Sprague-Dawley, которые потребляли 5% раствор ДСН в течение 7 суток. Животных выводили из эксперимента на 7-ые сутки. В этой работе авторы не привели сведения о морфологической тяжести колита. Миентеральное сплетение на тотальных препаратах было выявлено с помощью антител к нейрональным маркерам HU, nNOS (NO синтаза), ChAT (ацетилхолинтрансфераза). По сравнению с контрольной группой при остром язвенном колите общее количество миентеральных нейронов, а также соотношение нитрергических и холинергических нейронов на ганглий не различалось.

D. Moynes et al. (2014) индуцировали язвенный колит у самцов мышей линии CD1. Питьевую воду заменяли 5% раствором ДСН на 5-ые сутки. Животных выводили из эксперимента на 7-ые сутки. Авторы не проводили оценку морфологических проявлений колита. Исследовали миентеральное и субмукозное сплетения на тотальных препаратах с помощью антител к глиальным клеткам GFAP и нейрональным маркерам HuD, PGP 9.5. У мышей с острым колитом отмечено снижение количества нейронов в миентеральных ганглиях.

J. Belkind-Gerson et al. (2015) индуцировали колит у мышей C57Bl/6 потреблением 3% раствора ДСН в течение 7 суток. Авторы не указали пол животных. Мышей выводили из эксперимента на 9-ые сутки. Миентеральные нейроны были выявлены на тотальных препаратах с помощью антител к HuC/D, глиальные клетки – GFAP, нейрональные стволовые клетки – к нестину. Для оценки пролиферации клеток ЭНС внутрибрюшинно вводили EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). Исследовали дистальный отдел ободочной кишки и проводили полуколичественную оценку морфологической тяжести колита. При тяжелом остром колите выявлено увеличение общего числа миентеральных нейронов, а среди них увеличилось количество клеток с колоколизацией HuC/D и нестина. В то же время количество GFAP-положительных глиальных клеток не изменялось. Выраженность морфологических проявлений колита положительно коррелировала с увеличением показателя абсолютного количества нейронов. Авторами сделан вывод о стимуляции процесса нейрогенезе в ЭНС в ответ на воспаление кишки.

M. Blennerhassett et al. (2017) моделировали острый колит у самок мышей CD1 и BALB/c заменой питьевой воды на 5% ДСН на 5 суток. Животных выводили из эксперимента на 8-ые сутки. Структуры ЭНС выявляли ИФ методами на гистологических срезах с применением антител к HuD для выявления тел нейронов, SNAP-25 для выявления их отростков. При ДСН-индуцированном колите не было отмечено изменений количества миентеральных нейронов, число аксонов в мышечной оболочке у мышей BALB/c возросло, а у CD1 мышей не изменилось.

В работе A. Cervi et al. (2017) колит индуцировали у самцов мышей CD1. Для индукции острого колита воду заменяли на 5% раствор ДСН на 5 суток, животных выводили из эксперимента на 7-ые сутки. При индукции хронического колита животные потребляли 1.5% раствор ДСН 3 раза по 5 суток с промежутками между циклами в 7 суток. На криосрезах дистального отдела ободочной кишки исследовали ИФ с антителами к тирозин гидроксилазе. При остром и хроническом колите количество волокон, позитивных по тирозин гидроксилазе возросло в мышечной оболочке. Отмечено прорастание симпатических волокон в СПСО при остром и хроническом колите, но их количественные показатели в ней не отличались между животными контрольной группы и с колитом.

Таким образом, модель ДСН-индуцированного язвенного колита является адекватной для изучения ЭНС и позволяет воспроизводить как острый, так и хронический колит. Литературные данные об изменениях ЭНС, полученные на этой модели, немногочисленны, противоречивы и ограничены оценкой количества ганглиев, нейронов и глиальных клеток. Эти противоречия, видимо, обусловлены различиями вида, линии и пола животных, длительности эксперимента, тяжести колита и используемых методов маркирования и морфометрической оценки структур ЭНС.

Экспериментальная модель колита, индуцированного тринитробензол- или динитробензолсульфоновой кислотой

ТНБС и ДНБС являются гаптенами и связываются с собственными и бактериальными белками, активируя реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа с развитием воспалительного процесса в стенке кишки (Morampudi V. et al., 2014). ТНБС- или ДНБС-индуцированный колит морфологически проявляется воспалением слизистой оболочки, подслизистой основы или трансмуральным воспалением (Brenna Ø., 2013). К настоящему времени изменения ЭНС при ТНБС- или ДНБС-индуцированном колите описаны в сравнительном небольшом числе работ.

В миентеральном сплетении при ТНБС- или ДНБС-индуцированном колите описано снижение числа миентеральных (Kinoshita K. et al., 2007) и субмукозных ганглиев (Sanovic S.

et al., 1999), уменьшение числа миентеральных нейронов (Sanovic S. et al., 1999; Boyer L. et al., 2005; Linden D. et al., 2005,2012; Gulbransen B. et al.,2012; Talapka P., 2014; Robinson A. et al., 2014,2017;Da Silva M. et al., 2015, 2017; Ippolito C. et al., 2015; Stavely R. et al., 2015; Blennerhassett M. et al., 2017) или отсутствие их изменений (Winston J. et al., 2013), уменьшение количества субмукозных нейронов (Da Silva M. et al., 2017), повреждение внутримышечных волокон (Lourenssen S. et al., 2005; Blennerhassett M. et al., 2017) и их последующая гипертрофия (Lourenssen S. et al., 2005), повреждение волокон в слизистой оболочке (Robinson A. et al., 2014, 2017), избирательное повреждение интестинофугальных (Linden D., 2012) и холинергических нейронов в миентеральных ганглиях (Robinson A. et al., 2014, 2017), снижение (Da Silva M. et al., 2015, 2017) или повышение количества глиальных клеток (Ippolito C. et al., 2015).

Таким образом, ТНБС- или ДНБС-индуцированный колит характеризуется более выраженным повреждением ЭНС чем ДСН-индуцированный, что связано с трансмуральным, но локальным характером воспаления.

Морфологические изменения энтеральной нервной системы при язвенном колите и болезни Крона у человека

Данные литературы, посвященные морфологическим и функциональным нарушениям ЭНС при ЯК и БК у человека, фрагментарны и противоречивы (Villanacci V., 2008). В литературном обзоре К. Geboes и S. Collins (1998) приведен метаанализ изменений ЭНС при БК и ЯК у человека. На светооптическом и электронно-микроскопическом уровне изменения ЭНС характеризуются гипертрофией, гиперплазией и признаками альтерации нейронов, их отростков и глиальных клеток (Dvorak A. et al., 1993; Geboes K., Collins S., 1998). При БК гипертрофия нервных волокон выявляется во всех оболочках кишки, но она наиболее выражена в подслизистой основе. При ЯК гипертрофированные нервные волокна встречаются редко. Кроме гипертрофии при БК и ЯК отмечается гиперплазия нервных волокон. Эти изменения часто сочетаются с ганглионевритом, характеризующимся воспалительной инфильтрацией энтеральных ганглиев лимфоцитами, плазмощитами и тучными клетками (Geboes K., Collins S., 1998; Ohlsson B. et al., 2007).

На ультраструктурном уровне аксоны энтеральных нейронов при БК или ЯК вакуолизированы, набухшие, с повреждением внутриклеточных органелл (Dvorak A. et al., 1980, 1993; Geboes K., Collins S., 1998). Отмечается уменьшение количества нейрон-специфических структур, повышение числа лизосом или полное разрушение аксонов с образованием пустых, отграниченных клеточной мембраной полостей (Riemann J., Schmidt H.,

1982; Dvorak A. et al., 1993). Поврежденные аксоны выявляются и в норме, однако их количество при болезни Крона выше (Geboes K., Collins S., 1998; Steinhoff M. et al., 1988).

В миентеральных и субмукозных ганглиях при ЯК и БК нейроны гипертрофированы и гиперплазированы. Гипертрофия нейронов, особенно в субмукозном сплетении, более характерна для ЯК. Гиперплазия нейронов при ВЗК встречается чаще, чем гипертрофия. В очагах воспаления наряду с гиперплазией нередко отмечаются альтеративные изменения аксонов. Морфологические изменения нейроглии при ВЗК охарактеризованы в меньшей степени, при БК отмечается гиперплазия глиальных клеток (Geboes K., Collins S., 1998).

Таким образом, число работ, посвященных изучению ЭНС у человека при ЯК и БК, ограничено. В них описывается как альтеративные, так и репаративные изменения ЭНС в виде гипертрофии и гиперплазии нейронов и их отростков.

Функциональные изменения энтеральной нервной системы при воспалительных заболеваниях кишечника у человека и экспериментальных животных

По данным С. Murray и А. Emmanuel (2004) функциональные нарушения кишечника, развивающиеся при ВЗК, связаны с изменениями его основных функций – моторной, секреторной и абсорбционной. Нарушения функционирования толстого кишечника проявляются обстипацией и диареей. Диарея в норме — стереотипный ответ на наличие раздражающих или токсических веществ в просвете кишки. Помимо моторных нарушений в виде ускорения прохождения кишечного содержимого, при ней усиливается интестинальная секреция, висцеральная чувствительность и снижается абсорбция жидкости (Spiller R., 2004).

Нарушения моторной функции органов ЖКТ при ЯК являются основными клиническими проявлениями заболевания. Отмечено усиление пропульсивной активности и ускоренный транзит кишечного содержимого (Bassotti G. et al., 2014). Однако, также может отмечаться замедленный транзит кишечного содержимого с развитием проксимального стаза, особенно у пациентов в острой фазе заболевания (Allison M., Vallance R., 1991). Одним из вероятных механизмов развития нарушения моторики толстого кишечника при ЯК является избыточная продукция тормозных нейромедиаторов, таких как NO. В нарушении моторики толстой кишки также играют роль нейро- и иммуномедиаторы - субстанция P, нейротензин, тахикинины, интерлейкин-1 и др. (Bassotti G. et al., 2014).

Кроме моторных и секреторных нарушений у больных ЯК отмечается изменение афферентной иннервации органов ЖКТ – висцеральная гиперчувствительность. Эти функциональные изменения часто длительно персистируют и в периоде ремиссии. Аллодиния и гиперальгезия органов ЖКТ в сумме рассматривается как висцеральная гиперчувствительность (Krauter E. et al., 2007; Vermeulen W. et al., 2014).

Наряду с собственной нервной системой органов ЖКТ при ВЗК вовлекается симпатическая и парасимпатическая нервная система. В период обострения отмечается гипотили гиперрефлексия, при ЯК - усиление симпатической и снижение парасимпатической реакции, при БК и на экспериментальных моделях - снижение активности парасимпатической нервной системы (Furlan R. et al., 2006; Brierley S. et al., 2015).

Функциональные изменения толстой кишки изучены и на экспериментальных моделях колита (Mawe G., 2015). На модели ДСН-индуцированного колита отмечено повышение чувствительности кишки к аналогу ацетилхолина карбахолу (Hock M. et al., 2011), замедление времени транзита кишечного содержимого через кишку и снижение ответа в дистальном отделе ободочной кишки на стимуляцию электрическим током (Mizuta Y. et al., 2000), изменение серотонинового сигналинга в слизистой оболочке (Matsumoto K. et al., 2012), отсутствие афферентной гипермеханочувствительности, гиперальгезии на колоректальное растяжение, но повышение висцеральной чувствительности к капсаицину и серотонину (Brierley S., 2016).

1.3. Механизмы повреждения, гибели и пластичности энтеральных нейронов

Виды и механизмы клеточной гибели нейронов и других клеток

Механизмы клеточной смерти нейронов детально описаны в монографии L. Lossi et al. (2015) и обзоре М.А. Савицкой и Г.Е. Онищенко (2015). На морфологическом и биохимическом уровне различают типичные формы клеточной смерти - некроз, апоптоз, аутофагию, и атипичные формы, такие как параптоз, пироптоз, пиронекроз и энтоз (Kroemer G. et al., 2009). Для нейронов кроме перечисленных видов клеточной смерти также характерны вальберьянова дегенерация и смерть по механизму эксайтотоксичности (Kroemer G. et al., 2009). Некоторые авторы полагают, что существует непрерывный континуум типов клеточной смерти от некроза до апоптоза (Syntichaki P., Tavernarakisa N., 2002; Elmore S., 2007), при этом некроз, как и апоптоз, может быть контролируемым (Coburn C. et al., 2013).

Некроз - это катастрофическая энергонезависимая клеточная смерть, наступающая при воздействии на клетку чрезмерного стресса в виде аноксии, нехватки питательных веществ, повышения температуры, токсических веществ и физического повреждения. Ключевыми механизмами некроза является нарушение энергетического баланса клетки и повреждение клеточных мембран (Golstein P., Kroemer G., 2007). При некрозе при микроскопическом исследовании клетка набухает и теряет четкость границ, хроматин образует гранулы, развивается кариолизис (Syntichaki P., Tavernarakisa N., 2002; Kroemer G. et al., 2009). При этом некротизированные клетки образуют в тканях обширные скопления (Elmore S., 2007). На

ультраструктурном уровне некроз клетки проявляется набуханием митохондрий и повреждением их мембран, расширением эндоплазматического ретикулума, выраженной вакуолизацией цитоплазмы, дезинтеграцией лизосом и, в конечном итоге, разрушением клеточной мембраны (Syntichaki P., 2003; Elmore S., 2007).

Апоптоз - это один из вариантов программируемой, энергозависимой клеточной смерти нейронов, играющий важную роль в нормальном развитии и патологических состояниях организма (Elmore S., 2007; Lossi L. et al., 2015). На светооптическом уровне на начальной стадии апоптоза отмечается конденсация и сегрегация хроматина, что придает ядру форму полумесяца (Lossi L. et al., 2015). В дальнейшем происходит кариопикноз и кариорексис. Клетки в состоянии апоптоза рассеяны в тканях поодиночке или в виде небольших групп, воспалительная реакция вокруг них не выражена (Elmore S., 2007). На ультраструктурном уровне клетка на начальной стадии апоптоза уменьшается в размере и становится пикнотической. Одновременно с этим происходит конденсация цитоплазмы, клетка приобретает звездчатые очертания. Цитоплазматические органеллы в целом не претерпевают изменений, но уплотняются, возможно появление вакуолей и дезинтеграция шероховатого ретикулума. По мере прогрессирования апоптоза клетка приобретает неправильные очертания, от ядра начинают отпочковываться его фрагменты, окруженные ядерной мембраной. Образующиеся апоптотические тельца поглощаются макрофагами или, в ЦНС, клетками микроглии (Elmore S., 2007; Lossi L. et al., 2015). Развитие апоптоза возможно по двум основным механизмам - внешнему, опосредованному через клеточные рецепторы смерти и внутреннему, опосредованному через митохондрии (Elmore S., 2007). Оба пути апоптоза приводят к активации каспаз, таких как каспаза-3, -6 и -7, которые являются эффекторами апоптоза (Elmore S., 2007; Lossi L. et al., 2015). Развитие клеточной смерти до определенного этапа может быть обратимым процессом (Geske F. et al., 2001; Elmore S., 2007). Достоверными морфологическими признаками смерти клетки является потеря целостности клеточной мембраны, фрагментация клетки и ее ядра на дискретные фрагменты, поглощение ее тела или фрагментов другой клеткой (Kroemer G., 2009; Elmore S., 2007).

Аутофагия характеризуется секвестрацией цитоплазматического материала в двумембранных аутофагосомах. Аутофагосомы сливаются с лизосомами с образованием аутолизосом, в последних содержится аутофагосом и их внутренняя мембрана лизируется кислыми лизосомальными гидролазами. Аутофагическая смерть клетки характеризуется массивной вакуолизацией цитоплазмы при отсутствии конденсации хроматина (Kroemer G. et al., 2009; Lossi L. et al., 2015).

Валерианова дегенерация - специфическая форма клеточной гибели нейронов, которая развивается при повреждении аксонов, ее механизмы подробно описаны в обзоре M. Burnett и E. Zager (2004). Валерианова дегенерация развивается из отграниченного локуса повреждения аксона и распространяется на всю его длину дистальнее участка повреждения – антероградная дегенерация (Pavelka M., Roth J., 2006). В зависимости от степени повреждения ее тяжесть может варьировать от нейропраксии, при которой происходит временное нарушение проводимости волокна, до массивного поражения множества аксонов с воспалительной инфильтрацией и кровоизлияния и последующим формированием рубца (Burnett M., Zager E., 2004). Изменения нейрона при повреждении его аксонов зависят от тяжести повреждения. Валерианова дегенерация - это вариант клеточного катаболизма, в ее результате сам нейрон может не подвергаться гибели, однако при массивных повреждениях аксона, особенно в его проксимальном участке возможна инициация апоптоза нейрона. В течение 6 часов после повреждения ядро нейрона мигрирует на периферию клетки и субстанция Ниссля рассеивается, наблюдается центральный хроматолиз. Если в результате валериановой дегенерации нейрон гибнет, то аксон дегенерирует на всем своем протяжении (Burnett M., Zager E., 2004)

Эксайтотоксичность – один из вариантов программируемого некроза нейрона (Wang Y., Qin Z., 2010; Coburn C. et al., 2013). Гибель нейрона в этом случае происходит вследствие его гиперстимуляции возбуждающим нейротрансмитером глутаматом. Продолжительная активация глутаматных рецепторов приводит к притоку в цитозоль внеклеточных ионов кальция и запускает процессы апоптоза или некроза (Coburn C. et al., 2013).

Механизмы гибели нейронов энтеральной нервной системы

Конкретные механизмы гибели нейронов ЭНС при ВЗК изучены недостаточно. Однако, по данным ряда исследований показано, что нейроны ЭНС гибнут преимущественно путем апоптоза и, реже, некроза (Boyer L. et al., 2005; Mei F. et al., 2009; Lakhan S., Kirchgessner A., 2010). При БК в миентеральных и субмукозных ганглиях отмечено существенное увеличение количества нейронов и глиальных клеток в состоянии апоптоза. У больных с ЯК в миентеральных и субмукозных ганглиях отмечается выраженный апоптоз глиальных клеток (Bassotti G., 2009).

Существует несколько механизмов инициации апоптоза энтеральных нейронов. Одним из них является иммунный механизм, опосредованный Т-клетками (Boyer L., 2005; Lakhan S., Kirchgessner A., 2010). Однако роль иммунных механизмов в гибели нейронов при ВЗК подвергается сомнению некоторыми исследователями (Gulbransen B. et al., 2012).

К апоптозу нервных клеток при колите может приводить изменение микроокружения нейронов, например, повышение концентрации внеклеточного АТФ и последующей активации пуринергических P2X7Rs рецепторов (Gulbransen B. et al., 2012; Kurashima Y. et al., 2012). При этом погибают преимущественно нитрергические нейроны (Gulbransen B. et al., 2012). Глутамат также может приводить к гибели нейронов по механизму эксайтотоксичности (Kirchgesner A. et al., 1997). Важным медиатором воспаления, способным вызвать повреждение нейронов является оксид азота (NO), который синтезируется iNOS в иммунных клетках (Miampramba M., Sharkey K., 1999). Высокая концентрация NO приводит к апоптозу и некроптозу нейронов за счет развития оксидативного стресса (Venkataramana S. et al., 2015; Brown I. et al., 2016). Апоптоз нейронов ЭНС может развиваться по каспаза-3 зависимому и каспаза-3 независимому пути. В этом процессе важную роль играют тканевые транскляминазы, активность которых повышается при ВЗК (Lakhan S., Kirchgesner A., 2010).

В гибели энтеральных нейронов при патологических состояниях важную роль играют глиальные клетки. Избирательная элиминация глиальных клеток в эксперименте приводит к гибели нейронов, что указывает на важность глии для поддержания жизнеспособности энтеральных нейронов. Активация глиальных клеток ЭНС, аналогичная реактивному астроглиозу ЦНС, также может приводить к гибели нейронов путем запуска коннексин-43-зависимого механизма смерти вследствие продукции NO, АТФ и последующего оксидативного стресса (Brown I. et al., 2016).

Восстановление и пластичность нейронов энтеральной нервной системы

Краткосрочная и долгосрочная нейропластичность ЭНС при ВЗК, подробно описана преимущественно на моделях экспериментального колита в обзоре S. Brierley и D. Linden (2014). Под нейропластичностью понимают способность нервной системы сохранять или изменять функции при повреждении путем изменения функциональной активности сохранившихся нейронов и их отростков (Lomax A. et al., 2005) или образования новых (Schäfer K. et al., 2009). Морфологически нейропластичность может проявляться изменением числа нейронов и глиальных клеток и их отростков. В ряде работ показано как отсутствие изменения числа аксонов в мышечной оболочке при экспериментальном колите (Sanovic S. et al., 1999), так и повышение их количества в ответ на пролиферацию миоцитов (Lourenssen S. et al., 2005; Blennerhassett M. et al., 2017).

В периферической нервной системе после повреждения аксона инициируются механизмы его регенерация, что сопровождается изменениями клеточного метаболизма, возбудимости, синаптических связей поврежденного нейрона с активным синтезом в нем

протеинов и формированием конуса роста – спрутинг (Huebner E., Strittmatter S., 2009; Niekerk E. et al., 2016). С помощью химических веществ, действующих как «нейроаттрактанты» и «нейрорепелленты» и выделяемых окружающими клетками, аксон восстанавливает иннервацию целевых структур (Zou Y., 2006; Huebner E., Strittmatter S., 2009). Одним из основных веществ, обеспечивающих регенерацию аксонов и поддержание жизнеспособности нейронов, является фактора роста нервов (Nerve Growth Factor; NGF). Несмотря на то, что конкретные механизмы спрутинга аксонов при ВЗК и на моделях экспериментального колита остаются неизученными, некоторые авторы полагают что NGF, который продуцируется гладкими миоцитами мышечной оболочки и нейротрофин NT-3 стимулируют регенерацию аксонов (Lin A. et al., 2005; Lourenssen S. et al., 2005).

Ряд авторов предполагает, что восстановление или долговременная компенсация нарушений, возникающих при ВЗК возможны благодаря нейрогенезу энтеральных нейронов из прогениторных или глиальных клеток у взрослых животных и человека (Gershon M. 2011; Kulkarni S. et al., 2017). В литературе имеются данные как об отсутствии нейрогенеза в ЭНС у взрослых животных в норме и при патологии (Joseph N. et al., 2011), так о высокой интенсивности нейрогенеза у взрослых мышей в норме (Kulkarni S. et al., 2017), а на экспериментальных моделях выявлен возможный серотонин-зависимый нейрогенез в ответ на повреждение ЭНС (Liu M. et al., 2009; Goto K. et al., 2013; Belkind-Gerson J. et al., 2015). В целом, однако, существующие научные данные не позволяют сделать однозначного заключения о наличии или отсутствии нейрогенеза как одного из механизмов нейропластичности ЭНС.

Таким образом, структуры ЭНС ободочной кишки в норме, при ВЗК у человека и на экспериментальных моделях изучены недостаточно. Данные об изменениях числа нейронов, глиальных клеток и гистоархитектоники нервных сплетений в стенке толстой кишки не позволяют сформулировать представление об участии ЭНС в патогенезе ЯК. Изучению этих вопросов и посвящено настоящее исследование.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика материала

В работе использованы половозрелые самцы мышей линий C57Bl/6 (n=77), полученные из питомников: "Столбовая" - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России"; "Андреевка" - Научно-производственное подразделение «Питомник лабораторных животных Филиал Института биоорганической химии РАН»; "Пушино" - Научно-производственное подразделение Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Перед экспериментом животных дегельминтизировали препаратом «Празицид» 1% суспензии в питьевой воде в течение 1 недели. Возраст животных в начале эксперимента составлял 8-10 недель, масса тела 20-25 г. Животных содержали при температуре 20°C и естественном освещении, они получали полнорационный комбикорм для лабораторных животных - ПК 120-2_764 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92) и питьевую воду ad libitum. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977г и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №15 от 16.12.2014).

Моделирование острого и хронического колита

Модель острого и хронического ЯК, вызванного ДСН, воспроизводили по I. Okayasu et al. (1990). Экспериментальные группы приведены в таблице 1. Для воспроизведения острого колита мышам заменяли питьевую воду на 2.5-5.0% раствор ДСН (молекулярная масса 50000 кДа; AppliChem) на 5 или 6 суток, мышей выводили из эксперимента на 7-ые или 9-ые сутки. На момент выведения животных из эксперимента их возраст составлял 9-10 недель. Для моделирования хронического колита мыши получали 1.0-1,5% ДСН повторными циклами. Каждый цикл длился от 3 до 7 суток, их количество - от 3 до 4, промежутки между циклами составляли 7 суток (табл. 2). Для воспроизведения воспалительного процесса, патогенетически сходного с ЯК у человека, сроки выведения животных определяли эмпирически в зависимости от клинической картины. Животных выводили из эксперимента на 57, 70, 89 и 152-ые сутки после начала эксперимента и не менее чем через 4 недели после окончания последнего цикла потребления ДСН. Возраст животных на момент выведения из эксперимента составлял от 18 до 28 недель.

Таблица 1

Экспериментальные группы животных

Концентрация ДСН	Длительность эксперимента в сутках	Кол-во животных контроль/опыт	Питомник и методы
Острый колит			
2.5%	7	5/5	«Андреевка», гистологическое и ИГХ исследование гистологических срезов, маркированных βIII-тубулином и S100b
5.0%-7.0%	9	5/6	«Пушино», ИФ исследование гистологических срезов, маркированных HuC/D, S100b, nNOS, каспазой-3 и тотальных препаратов, маркированных HuC/D и S100b, электронная микроскопия
5.0%	7	5/5	«Столбовая», оценка функционального состояния ЖКТ, ИФ исследование тотальных препаратов, маркированных βIII-тубулином
5.0%	5	4/4	«Столбовая», оценка функционального состояния ЖКТ
Хронический колит			
1.0%	57	5/5	«Столбовая», гистологическое и ИГХ исследование гистологических срезов, маркированных βIII-тубулином и S100b
1.0%	70	4/4	«Столбовая», исследование тотальных препаратов, маркированных βIII-тубулином
1.0%-1.5%	89	5/5	«Пушино», ИФ исследование гистологических срезов, маркированных HuC/D, S100b, nNOS, каспазой-3.
1.0%	51 (функциональное состояние)	5/5	«Столбовая», оценка функционального состояния ЖКТ, ИФ исследование тотальных препаратов, маркированных S100b и HuC/D
	152 (тотальные препараты)		

Таблица 2

Режимы индукции хронического колита у самцов мышей C57Bl/6

Питомник	Режим								Сроки выведения из эксперимента
	ДСН	Вода	ДСН	Вода	ДСН	Вода			
«Столбовая»	ДСН 1% 4 сут	Вода 7 сут	ДСН 1% 3 сут	Вода 7 сут	ДСН 1% 5 сут	Вода 28-42 сут			57 сут (ИГХ) 70 сут (тотальные препараты)
«Пушино»	ДСН 1% 5 сут	Вода 7 сут	ДСН 1% 4 сут	Вода 7 сут	ДСН 1% 8 сут	Вода 7 сут	ДСН 1.5% 7 сут	Вода 45 сут	89 сут
«Столбовая»	ДСН 1% 4 сут	Вода 7 сут	ДСН 1% 3 сут	Вода 7 сут	ДСН 1% 5 сут	Вода 126 сут			152 сут

Животных взвешивали в начале и конце эксперимента, ежедневно оценивали их общее состояние, консистенцию фекалий и наличие в них крови. Животных опытных и контрольных групп выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира и цервикальной дислокацией.

2.2. Методы исследования

Методы оценки функционального состояния желудочно-кишечного тракта

Проводили оценку моторной и абсорбционной функции органов ЖКТ. Животных помещали в индивидуальные пронумерованные контейнеры со свободным доступом к пище и воде. Для оценки абсорбционной функции ЖКТ проводили сбор и взвешивание свежих образцов кала. Образцы помещали в термостат +60 С° на 4-5 часа до полного высушивания и взвешивали повторно. Процентное отношение воды в кале рассчитывали, как отношение сухой массы кала к изначальной. Время транзита кишечного содержимого исследовали с использованием 3% раствора кармина красного или синего Эванса в 0,5% растворе нитроцеллюлозы. Каждому животному перорально вводили 50 мкл раствора красителя. Каждые 10 минут, начиная с 1-го часа начала эксперимента, оценивали наличие окрашенных образцов фекалий. При появлении красителя в фекалиях наблюдение прекращали и подсчитывали время транзита.

Приготовление гистологических препаратов

Для гистологического исследования проводили вскрытие животных и забор проксимального, медиального и дистального отделов ободочной кишки. Кишку отмывали от содержимого в забуференном фосфатном растворе комнатной температуры, измеряли длину, расправляли и ориентировали продольно на миллиметровом фильтре. В зависимости от используемых методов органы фиксировали в жидкости Буэна, в нейтральном забуференном 10% формалине или глутаровом альдегиде в течение суток при комнатной температуре или ацетоне, или забуференном формалине при 4 С° в течение нескольких часов. Образцы тканей проводили по спиртовым растворам возрастающих концентраций с использованием гистологического аппарата Tissue Tek VIP5JR (Sakura, Япония), заливали в гистомикс, изготавливали продольные срезы толщиной 6 мкм на микротоме Microme Hm 340E (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы депарафинизировали ксилолом и регидратировали в нисходящих концентрациях этилового спирта. После окрашивания при необходимости дегидратации срезы проводили через возрастающие концентрации этилового спирта, ксилол, затем заключали в канадский бальзам или синтетическую среду. Окрашивание препаратов опытных и контрольных групп животных проводили одновременно в одинаковых условиях.

Гистологические методы окрашивания

Гистологические препараты всех групп окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Для выявления коллагена в стенке дистального отдела ободочной кишки использовали окрашивание пикросириусом красным (набор Picosirius Red Stain Kit, Polysciences inc.) с докрасиванием гематоксилином Майера.

Для выявления нейронов в миентеральных и субмукозных ганглиях гистологические срезы окрашивали по методу Ниссля. Срезы ободочной кишки нагревали на водяной бане до 71 С° в водном растворе крезила фиолетового и охлаждали до комнатной температуры. Препараты дифференцировали под контролем бинокулярного микроскопа (Premier, Китай) в 96° спирте до исчезновения голубой окраски, быстро обезвоживали в возрастающих концентрациях этилового спирта, ксилоле и заключали в канадский бальзам.

Иммуногистохимические методы исследования

Для ИГХ методов применяли продольные срезы дистального отдела ободочной кишки, фиксированные в жидкости Буэна. Для выявления нервных волокон и глиальных клеток использовали антитела к βIII-тубулину (кроличьи поликлональные, Abcam, ab18207) в титре 1:400 и S100b (кроличьи поликлональные, Abcam, ab868) в титре 1:200 на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки. Применяли систему детекции Histofine® Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., 414152F). Для демаскировки антигенных эпитопов срезы нагревали в цитратном буфере pH 6.0 (10 mM цитрата натрия, 0,05% Tween 20) в течение 20 минут в микроволновой печи (мощность 800W). Для инактивации эндогенной пероксидазы использовали 3% раствор H₂O₂, в качестве блокирующего раствора применяли PBS с 1% BSA, 0.05% Triton X-100. Инкубацию с первыми и вторыми антителами, разведенными в блокирующем буфере, проводили по 1 часу во влажной камере при комнатной температуре. Для ИГХ окрашивания использовали набор EnVision-HRP на основе хромогена 3,3'-диаминобензидина (Dako, S20005083). Реакцию оценивали под контролем микроскопа, по достижению максимально интенсивного окрашивания инкубацию в растворе 3,3'-диаминобензидина прекращали и промывали срезы в проточной воде. Докрасивание срезов осуществляли гематоксилином Майера, далее их дегидратировали и заключали в канадский бальзам или синтетическую среду. Использовали внутренний негативный контроль – на препаратах специфичность антитела оценивали в зонах, заведомо не содержащих маркируемые структуры.

Иммунофлуоресцентные методы исследования

Для ИФ методов маркирования ЭНС использовали продольные срезы дистального отдела ободочной кишки, фиксированные в 10% забуференном формалине. С целью выявления тел нейронов применяли антитела к HuC/D, конъюгированные с биотином (мышинные моноклональные, Molecular probes, A21272) в концентрации 1:50, для выявления глиальных клеток S100b (кроличьи поликлональные, Abcam, ab868) в концентрации 1:100, для выявления нитрегергических нейронов - антитела к pNOS (кроличьи поликлональные, Abcam, ab76067) в концентрации 1:100, для выявления апоптоза - антитела к каспазе-3 (кроличьи поликлональные, Abcam, ab13847) в концентрации 1:100, для выявления пролиферирующих клеток антитела к Ki67 (кроличьи поликлональные, Abcam ab15580) в концентрации 1:50. В качестве ИФ метки для HuC/D служил стрептавидин, конъюгированный с Alexa Fluor 555 (Thermofisher, S21381) в концентрации 1:100, для остальных антител вторые антитела, конъюгированные с FITC – флуоресцеин изотиоцианатом (козьи против кролика, Abcam, ab97050) в концентрации 1:100. Демаскировку иммунологических эпитопов осуществляли нагревом гистологических срезов в цитратном буфере pH 6.0 в течение 20 минут в микроволновой печи (мощность 800W). Использовали набор авидин-биотинового блока (Molecular Probes, e21390). В качестве блокирующего раствора применяли PBS с 1% BSA, 0.05% Triton X-100, 1% нормальной сывороткой козы, 0.05% азида натрия. Инкубацию с первыми и вторыми антителами и стрептовидиной меткой проводили во влажной камере при 4 С° в течение 12-14 часов. Препараты заключали под покровное стекло в среду для заключения Prolong Gold with DAPI (Thermofisher, P36931), для предотвращения проникновения атмосферного кислорода и окисления флуорохрома края покровных стекол герметизировали лаком. Хранение препаратов осуществляли при -20 С° в герметичной емкости. Применяли внутренний негативный и позитивный контроль, для Ki67 позитивным контролем служили эпителиальные клетки в базальных отделах крипт, для каспазы-3 поверхностный эпителий ободочной кишки и герминативные центры лимфоидных узелков.

Иммунофлуоресцентные методы исследования тотальных препаратов мышечной оболочки ободочной кишки

Для ИФ методов маркирования использовали тотальные препараты дистального отдела ободочной кишки. После вскрытия животного выделяли дистальный отдел ободочной кишки, и его фрагмент отсепаровывали и фиксировали или в ацетоне (4 С° в течение часа с последующим хранением при – 20 С°) при использовании антител к βIII-тубулину, или в нейтральном 4% забуференном формалине (4 С° в течение 12-14 часов) при использовании антител к HuC/D и S100b.

Для маркирования β III-тубулина после отмывки в PBS от фиксатора отсепаровывали слизистую оболочку и подслизистую основу от мышечной оболочки под бинокулярной лупой Premier с помощью офтальмологического пинцета и помещали мышечную или слизистую оболочку в блокирующий буфер (PBS, 0,05% Triton X-100, 2% BSA, 1% нормальная козья сыворотка). В качестве первых антител использовали антитела к β III-тубулину (кроличьи поликлональные, Abscam, ab18207) в титре 1:300, разведенные в блокирующем буфере. Инкубацию проводили на шейкере в течение ночи при 4 C°. В качестве вторых антител применяли антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Molecular probes, A11078) или FITC (Abscam, ab97050), в титре 1:300, имеющие идентичные характеристики. Фрагменты слизистой оболочки маркировали аналогичным образом, однако после отмывки от фиксатора их помещали на 12 часов в 2% раствор Triton X-100 в PBS для улучшения проникновения антител. Препараты заключали под покровное стекло в среду Prolong Gold with DAPI (Thermofisher, P36931), для предотвращения проникновения атмосферного кислорода и окисления флуорохромов края покровных стекол герметизировали лаком. Хранение препаратов осуществляли при -20 C° в закрытых контейнерах.

Для выявления S100b- и HuC/D-положительных структур фрагмент дистального отдела ободочной кишки фиксировали в 4% нейтральном забуференном формалине (Бивитрум) в течение 12-14 часов при 4 C°. После отмывки от фиксатора отсепаровывали слизистую оболочку и подслизистую основу. Для улучшения проникновения антител препараты помещали в 2% раствор Triton X-100 в PBS на ночь на шейкере при 4 C°. В качестве первых антител использовали антитела к S100b (кроличьи поликлональные, Abscam, ab868) в титре 1:100 и HuC/D, конъюгированные с биотином (мышинные моноклональные, Molecular probes, A21272) в титре 1:50, разведенные в блокирующем буфере. Инкубация с первыми антителами проходила в течение 1-2 суток на шейкере при 4 C°. В качестве вторых антител для S100b применяли антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Molecular probes, A11078) в титре 1:200, для HuC/D - стрептавидин, конъюгированный с Alexa Fluor 555 (Thermofisher, S21381)) в титре 1:100, инкубация с ними была аналогичной первым антителам. Препараты заключали под покровное стекло в среду Prolong Gold with DAPI (Thermofisher, P36931), для предотвращения проникновения атмосферного кислорода и окисления флуорохромов края покровных стекол герметизировали прозрачным лаком. Хранение препаратов осуществляли при -20 C° в герметичных емкостях.

Электронномикроскопические методы

Фрагменты дистального отдела ободочной кишки фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на какодилатном буфере рН 7.2-7.4 с последующей дофиксацией в 1% растворе четырехокси осмия, контрастировали в растворе уранилацетата в 70° спирте, последовательно обезвоживали в возрастающих концентрациях спирта и заливали в смесь эпон-эралдит. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме 8800 Ultratome III (LKB, Швеция). Полутонкие срезы для светооптической микроскопии окрашивали толудиновым синими. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе Рейнольдса.

Методы морфометрической оценки нейронов и глиальных клеток

В настоящее время не существует единой морфологической классификации нейронов ЦНС и ЭНС. Нейроны классифицируются на различные морфологические типы в зависимости от размеров, формы, числа отростков и других показателей. Одним из самых важных показателей является структура дендритного дерева и аксонов, так как морфология нейрона всегда неразрывно связана с его функцией (Kandel E. et al., 2012). В современной нейробиологии для классификации нейронов и оценки их состояния используются такие показатели как индекс Шолля и фрактальная размерность. Эти показатели чаще всего применяют для оценки нейронов, инъецированных флуоресцентной или иной меткой в культурах или толстых срезах, что позволяет выявить ветвления дискретного исследуемого нейрона. Методы серебрения, широко применявшиеся ранее, позволяют выявить отдельные нейроны. На окрашенных таким методом препаратах были описаны Догель-1, Догель-2, но их отличает случайный характер окрашивания клеток, зависящий от функционального состояния нейрона, и они в настоящее время замещены другими методами, такими как ИГХ и ИФ, а также внутриклеточными флуоресцентными сенсорами. Сложная гистоархитектоника ЭНС и ее тесная взаимосвязь с другими структурами в стенке кишки препятствует применению классических, разработанных для ЦНС, морфометрических подходов к ее изучению.

Количественная оценка ЭНС в нашем исследовании проведена по следующим параметрам:

1. Количество клеток на ганглий на срезах и в поле зрения на тотальных препаратах.
2. Относительная доля различных типов клеток.
3. Размер нейронов и их ядер при окрашивании по методу Ниссля.
4. Соотношение нейронов различной хромности при окрашивании по методу Ниссля.
5. Площадь, количество и минимальный диаметр Фере структур ЭНС, окрашенных ИГХ.

В нашем исследовании для оценки гистоархитектоники на тотальных препаратах были применены подходы, разработанные J. Gao et al. (2013).

Методы получения, обработки и анализа изображений

Для фотосъемки микропрепаратов использовали флуоресцентные микроскопы Zeiss AxioPlan 2 с цифровой камерой AxioCam HRc (Zeiss, Германия) и Leica DM2000 с цифровой камерой Ec3 (Leica, Германия). Цветные изображения получали с помощью программного обеспечения Zeiss Axiovision для микроскопа Zeiss и Leica Application Suit V4.4 для микроскопа Leica. Тотальные препараты ободочной кишки исследовали на лазерном конфокальном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 780. Ультратонкие срезы визуализировали в электронном микроскопе Zeiss Libra 120 при увеличении 8000-10000 и ускоряющем напряжении 80кВ.

Съемку гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, по методу Ниссля, пикросириусом красным и 3,3'-диаминобензидином проводили в светопольном микроскопе с использованием увеличения 100, 200 (Zeiss, Leica), 400, 600 (Leica) и 640 (Zeiss). Для препаратов, окрашенных пикросириусом красным, дополнительно осуществляли съемку с использованием поляризационных фильтров.

Всю обработку полученных изображений в процессе морфометрического и цитометрического анализа проводили в программном пакете ImageJ- Fiji (НИИ) 1.51h и при необходимости Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems). Для морфометрической оценки исследуемых структур применяли три методологических подхода: визуальный подсчет клеток: ручная и машинная сегментация. Сегментация - выделение неперекрывающихся сегментов на изображении, состоящих из гомогенных или находящихся в заданном диапазоне по тем или иным признакам групп пикселей. К таким признакам могут относиться яркость, текстура и др. показатели. Сегментация может быть пороговой, при которой каждый пиксель бинарно классифицируется по принадлежности к тому или иному классу, и мягкой, при которой каждому пикселю присваивается вероятность принадлежности к тому или иному классу (Pham D. et al., 2000). Для ручной сегментации структур применяли графический планшет Wacom.

При проведении предподготовки изображений перед визуальным подсчетом клеток или их сегментации удаляли шум с помощью нелинейного медианного фильтра, нелинейного фильтра Кувахары и функции Remove Outliers, при необходимости повышали контрастность с помощью кривых яркости и фильтра «Unsharp Mask». Для улучшения контрастности на ряде изображений использовали таблицы представления цвета (Look-up-tables) для придания псевдоокрашивания изображению. Для машинного измерения проведена сегментация изображения. В нашей работе мы использовали пороговую сегментацию. Для ее осуществления применяли функции Auto Threshold, Auto Local Threshold или подпакет в

составе ImageJ-Fiji для интерактивного машинного обучения “Trainable WEKA Segmentation”. Сегментированные изображения анализировали как набор частиц или как протяженные структуры. Функцию анализа частиц применяли для оценки дискретных элементов, таких как профили нервных волокон и глиальных клеток.

Показателем толщины анализируемых структур являлся минимальный диаметр Фере - минимальное расстояние между краями анализируемой структуры. Диаметр Фере является более устойчивым к геометрической неоднородности профилей по сравнению с вписанным эллипсом, чем и продиктован его выбор для оценки толщины нервных волокон (Olson E., 2011). Протяженные структуры, например, ганглии и нервные волокна, маркированные β III-тубулином на тотальных препаратах, оценивали с использованием следующих параметров: относительная площадь, периметр, отношение периметра к площади, количество ветвлений средней оси фигуры (скелета), средняя толщина.

Морфометрический анализ препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином и по методу Ниссля

Количественную оценку клеточного состава миелтеральных ганглиев проводили в соответствии с рекомендациями Р.М. Худоеркова (2014). Подсчет клеточного состава миелтеральных ганглиев на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, проводили в световом микроскопе при увеличении 400. Подсчитывали число миелтеральных и субмукозных ганглиев и показатели длины препарата. В миелтеральных ганглиях подсчитывали количество нормохромных, гипохромных, гиперхромных нейронов центрального сечения, то есть с четко визуализируемым ядром и ядрышком, нейронов с ядром без ядрышка, без ядра, пикнотических нейронов и глиальных клеток (Худоерков Р.М., 2014).

Подсчет проводили в 40 миелтеральных ганглиях на каждый препарат, в сумме 120 ганглиев на мыш. На фотоизображениях оценивали размеры сомы и ядра у 20 нейронов центрального сечения в миелтеральных ганглиях для каждого из трех отделов ободочной кишки (рис. 5).

Морфометрический анализ препаратов, окрашенных иммуногистохимически β III-тубулином и S100b

На микрофотоснимках препаратов, окрашенных ИГХ методами с антителами к β III-тубулину и S100b, в мышечной оболочке проводили выделение каналов 3,3'-диаминобензидина и гематоксилина с использованием функции “Color Deconvolution” и стандартных векторов “H+DAB”. В слизистой оболочке из-за большого количества интенсивно окрашенных ядер вместо этого применяли “Split channels” и “Image calculator” для подсчета объектов, окрашенных DAB, использовали красный канал.

Сегментацию структур ЭНС осуществляли с применением алгоритмов “Auto Threshold” и “Auto Local Threshold”. Применяли анализ частиц “Analyze Particles”. Оценивали относительную площадь, количество и минимальный диаметр Фере (рис. 6). В СПСО визуально подсчитывали число S100b-позитивных клеток.

Методы обработки и анализа флуоресцентных изображений гистологических срезов ободочной кишки

Съемку флуоресцентных препаратов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM2000 и лазерной конфокальной сканирующей системы Zeiss LSM 780 (Zeiss, Германия). На микроскопе Leica DM2000 для выделения каналов синей, зеленой и красной флуоресценции использовали наборы дихроматических зеркал и светофильтров. Применяли следующие сочетания зеркал и светофильтров: синий (Filter System A), зеленый (Filter System I3), красный (Filter System N2.1). Результирующие полноцветные изображения разбивали на три канала, трансформировали их в оттенки серого и комбинировали для создания композитных изображений, с помощью уровней яркости повышали их контрастность, а для удаления шума применяли медианный фильтр (рис. 7). На продольных срезах, маркированных NuC/D и S100b, подсчитывали количество нейронов и глиальных клеток в миентеральных ганглиях.

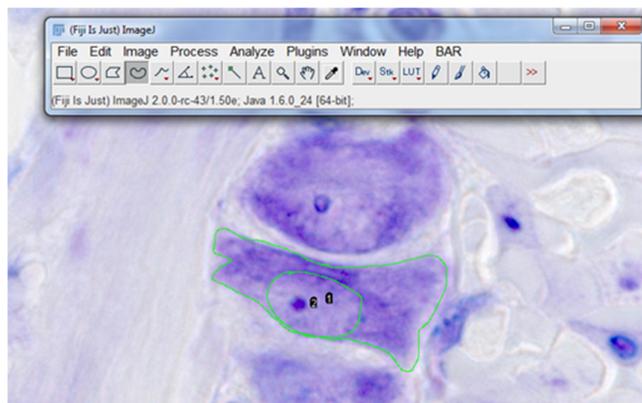


Рис. 5. Ручная сегментация и цитометрия нейронов миентеральных ганглиев на препаратах, окрашенных по методу Ниссля

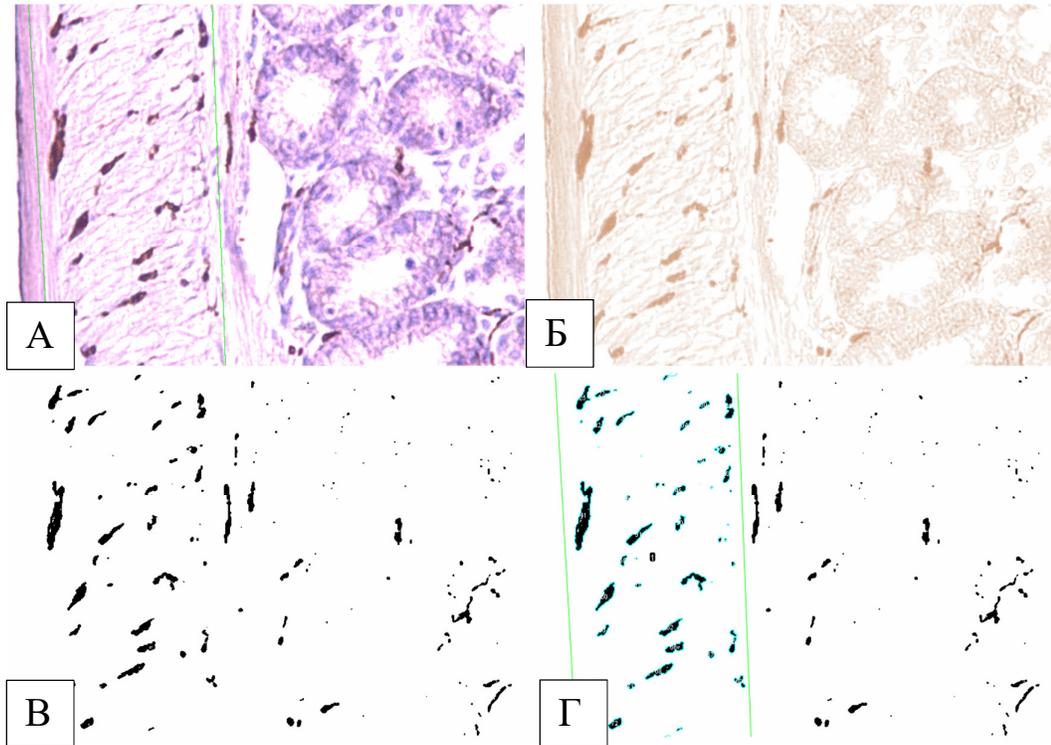


Рис. 6. Морфометрическая оценка β III-тубулин-положительных волокон в мышечной оболочке дистального отдела ободочной кишки. А – оригинальное изображение с выделенным фрагментом циркулярного слоя мышечной оболочки; Б – изолированный канал DAB; В – сегментированное изображение; С – выделение и анализ профилей нервных волокон. ИГХ окрашивание на β III-тубулин. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 200

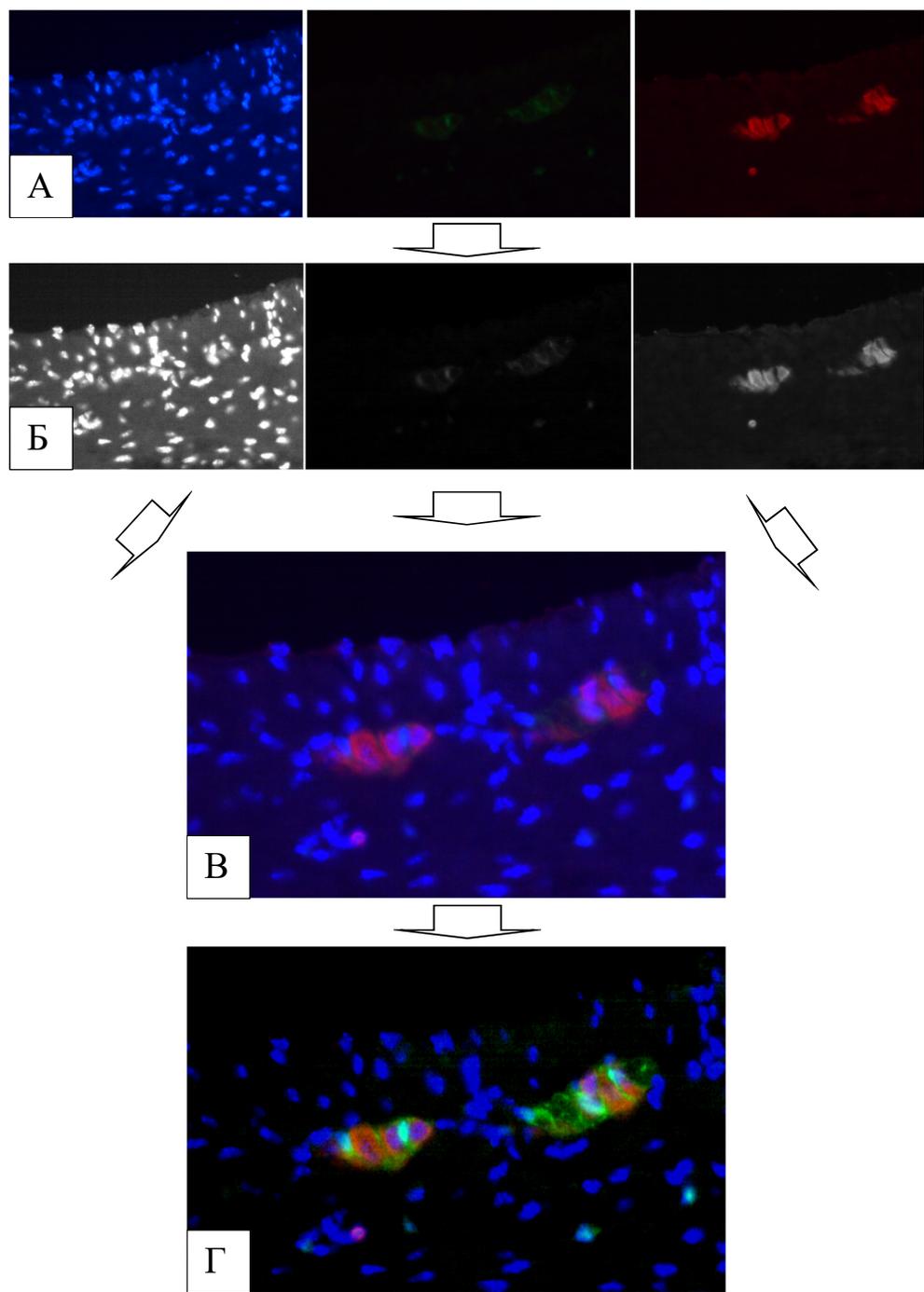


Рис. 7. Обработка ИФ изображений гистологических срезов дистального отдела ободочной кишки. А – оригинальные изображения в трех каналах; Б – изображения в оттенках серого; В – композитное изображение; Г – композитное изображение с усиленным контрастом. ИФ маркирование с антителами к HuC/D (красный) и S100b (зеленый), DAPI (синий). Флуоресцентный микроскоп. Ув. 400

На продольных срезах, маркированных антителами к HuC/D и nNOS, в миентеральных ганглиях подсчитывали общее количество нейронов и нейронов с визуальной колокализацией HuC/D и nNOS, выявляемой как желто-зеленое свечение цитоплазмы. На продольных срезах, маркированных HuC/D и каспазой-3, в миентеральных ганглиях полуколичественно подсчитывали общее количество нейронов и нейронов с небольшим, умеренным, большим количеством ИФ позитивных гранул в цитоплазме, а также нейроны, тотально заполненные гранулами (рис. 8).

На препаратах, маркированных HuC/D и Ki67 в миентеральных ганглиях оценивали наличие Ki67-позитивных клеток в составе ганглиев, а также колокализацию Ki67 с нейрональным маркером HuC/D.

Методы получения, обработки и анализа изображений тотальных препаратов ободочной кишки

Съемку флуоресцентных тотальных препаратов проводили на лазерной конфокальной сканирующей системе Zeiss LSM 780. На лазерном сканирующем конфокальном микроскопе при съемке препаратов, маркированных β III-тубулином и DAPI, применяли режим параллельной регистрации двух цветовых каналов, а при съемке препаратов, маркированных HuC/D, S100b и DAPI – режим последовательной съемки трех цветовых каналов. Для каждого канала подбирали оптимальную яркость. Полученные изображения имели три измерения – ширину, длину и глубину. Оптические срезы, содержащие миентеральные ганглии и нервные тракты, суммировали для создания проекции функцией “Z-project” (Max Intensity). Таким же образом реконструировали проекции внутримышечных волокон. Для выявления крупных структур на полученных изображения применяли медианный фильтр с размером зерна 15. Мелкие структуры выявляли вычитанием из оригинального изображения крупных. Для сегментации изображений использовали плагин интерактивного машинного обучения WEKA Trainable Segmentation, функции Auto Threshold или Auto Local Threshold.

На изображениях тотальных препаратов, маркированных β III-тубулином, подсчитывали следующие показатели: относительную и абсолютную площадь, занимаемую β III-тубулин-положительными структурами, их периметр, отношение периметра к площади. Подсчитывали количество ветвлений центральных осей структур. В плагине BoneJ оценивали среднюю толщину анализируемых структур. Этапы анализа изображений тотальных препаратов мышечной оболочки ободочной кишки, маркированных β III-тубулином и полученных на конфокальном микроскопе, представлены на рисунке 9. Для миентеральных ганглиев с нервными трактами и внутримышечных нервных волокон данные показатели рассчитывали отдельно.

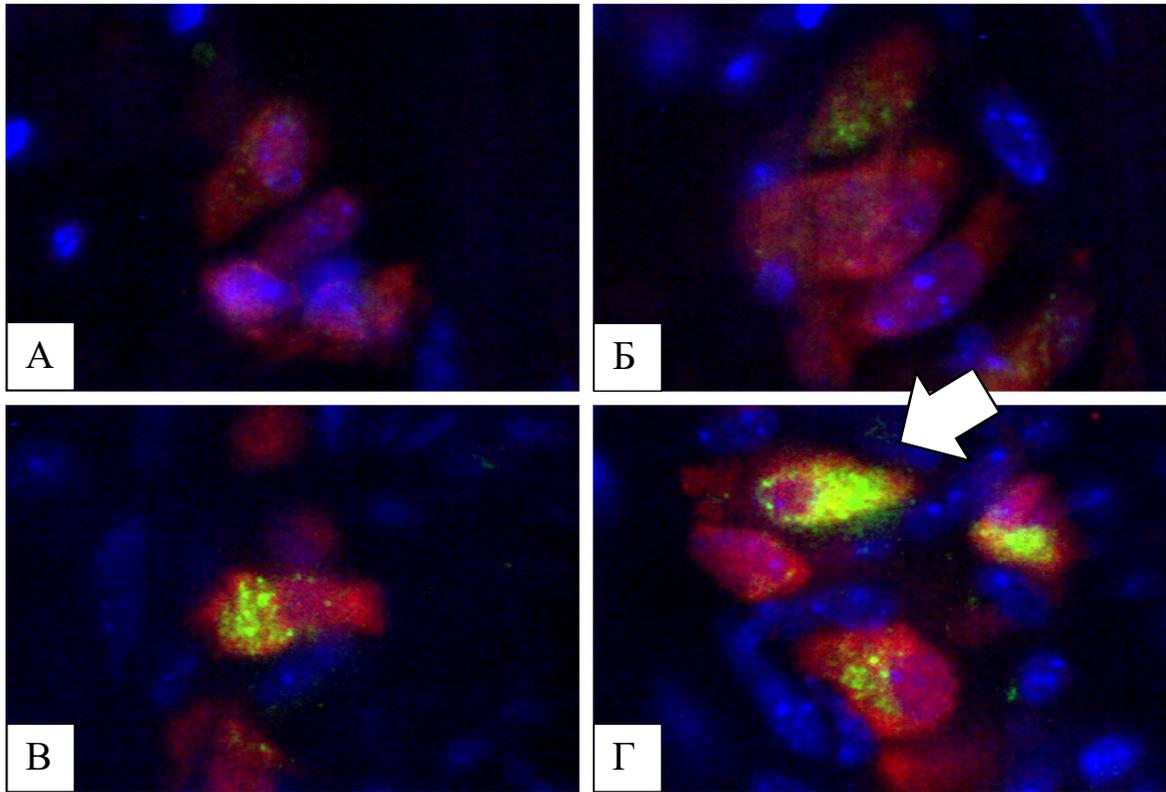


Рис. 8. Полуколичественная оценка нейронов в зависимости от интенсивности ИФ свечения при маркировании антителами к каспазе-3 и флуоресцентной метки FITC. А – отсутствие ИФ или единичные гранулы; Б – умеренное количество гранул; В – большое количество гранул; Г – тотальное заполнение цитоплазмы нейрона (стрелка) гранулами. ИФ маркирование антителками к HuC/D (красный) и каспазе-3 (зеленый), DAPI (синий). Флуоресцентный микроскоп. Ув. 400

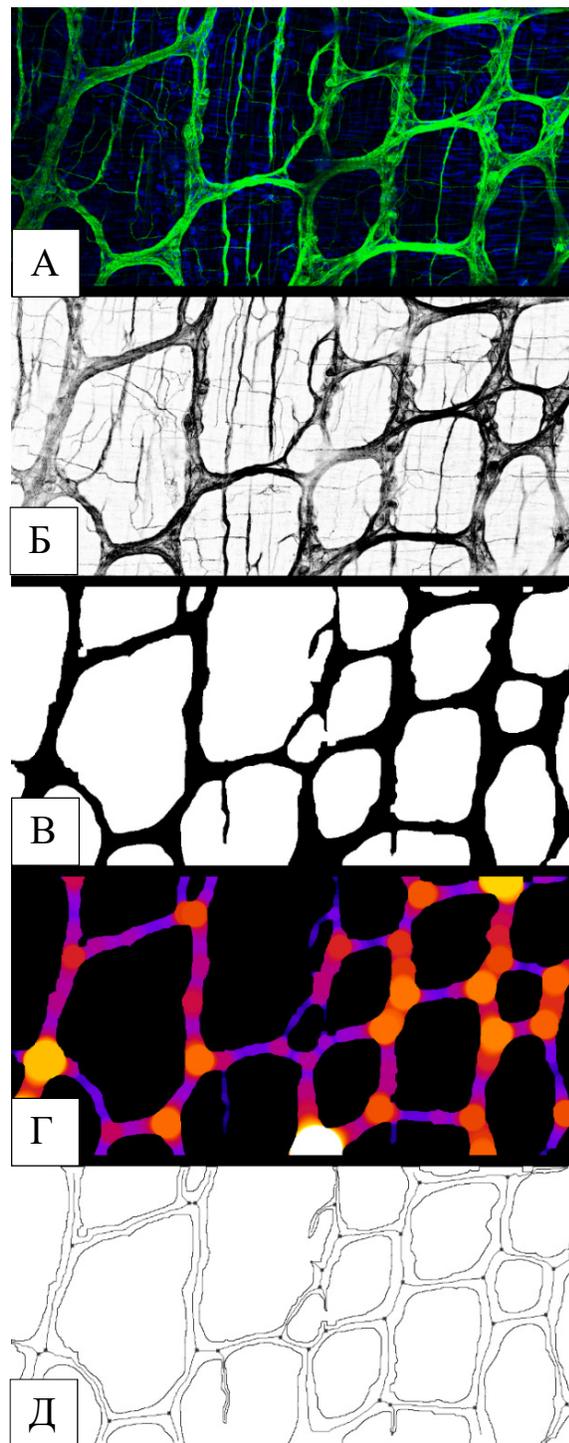


Рис. 9. Обработка изображения ИФ тотального препарата дистального отдела ободочной кишки, маркированного β III-тубулином и FITC, DAPI. А – оригинальные композитное изображения; Б – инвертированное изображение в оттенках серого для выявления внутреннего строения ганглиев; В – изображение, сегментированное с помощью Trainable WEKA Segmentation; Г – оценка средней толщины миентеральных ганглиев и нервных трактов в BoneJ; Д – формирование периметра и внутренней оси изображения с оценкой ветвления. β III-тубулин (зеленый), DAPI (синий). Конфокальная микроскопия

На изображениях тотальных препаратов, маркированных антителами к HuC/D и S100b, подсчитывали количество глиальных клеток и нейронов (рис. 10 А). Для этого канал FITC трансформировали в оттенки серого, инвертировали и модифицировали кривые яркости для усиления контраста ганглиев (рис. 10 Б). Далее проводили визуальный подсчет глиальных клеток, расположенных в пределах ганглиев и нервных трактов, а также в циркулярном слое мышечной оболочки. Количество HuC/D-положительных нейронов подсчитывали в изолированном инвертированном канале Alexa Fluor 555, переведенном в оттенки серого (рис. 10 В).

Статистические методы

Для статистического анализа применяли программу Statistica 8 (Statsoft). При наличии более одного измерения на животное вычисляли среднее значение. В таблицах и тексте данные приведены в виде медианы с первым и третьим квартилем. Обозначение диаграммы с размахом приведено на рисунке 11. С учетом небольших размеров групп и высокой вариабельности показателей статистическую обработку полученных данных проводили непараметрическими методами (U-критерий Манна-Уитни, множественного сравнения Крускала-Уоллиса, среднее Тьюки для апостериорного теста). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

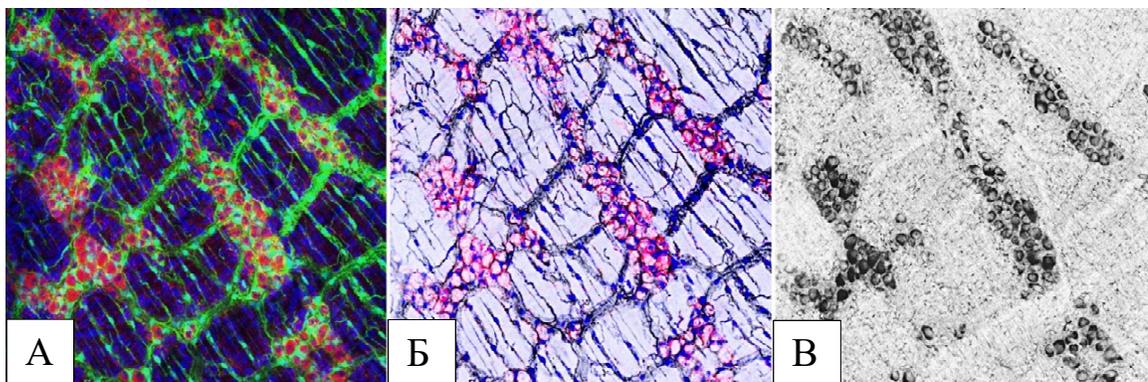


Рис. 10. Обработка изображения тотального препарата дистального отдела ободочной кишки, ИФ маркированного паннейрональным маркером NuC/D, глиальным маркером S100b и Alexa Fluor 555, FITC и DAPI. А – оригинальное композитное изображение; Б – глиальные клетки в оттенках серого и нейроны - красные (для визуального подсчета); В – инвертированный красный канал в градациях серого для подсчета нейронов. NuC/D (красный), S100b (зеленый), DAPI (синий). Конфокальная микроскопия

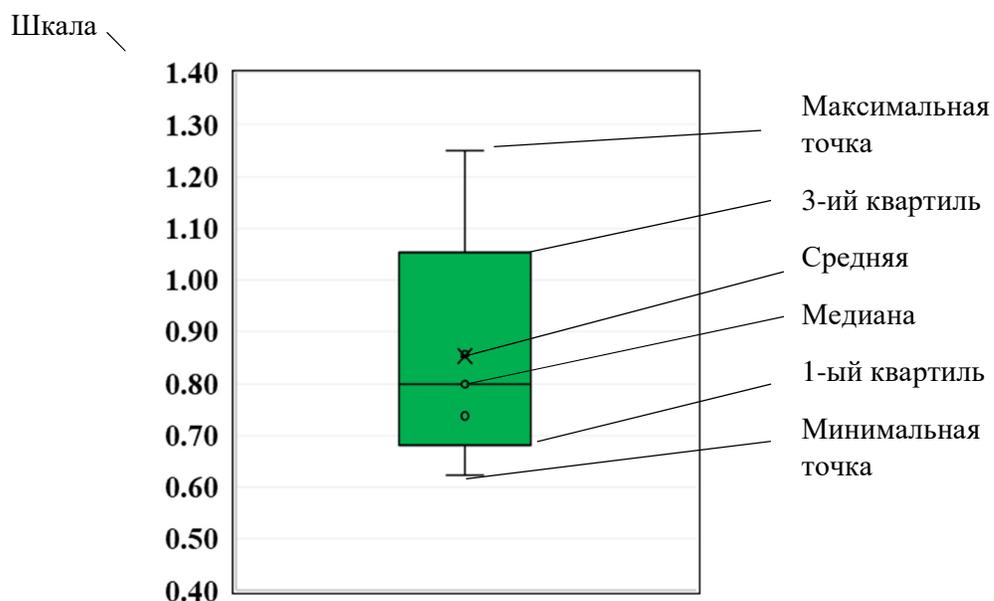


Рис. 11. Диаграмма размаха

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 в норме

Макроскопическая характеристика ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

Ободочная кишка у мышей контрольных групп была бледно-розовой окраски, в проксимальном отделе заполнена кишечным содержимым желто-коричневого цвета и мягкой консистенции, а в дистальном – бурого цвета и плотной консистенции (рис. 12). Ободочная кишка имела гирляндообразную форму из-за чередования зон с более узким и широким диаметром. В проксимальном отделе слизистая оболочка образовывала складки, расположенные косо по отношению к продольной оси кишки, эти складки сглаживались в медиальном и отсутствовали в дистальном отделе. Длина ободочной кишки от слепой до терминального отдела ободочной составляла 5.5 (5.0;5.7) см.

Морфофункциональная характеристика миентерального сплетения в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, миентеральное сплетение представлено образующими цепочку ганглиями, компактно расположенными между циркулярным и продольным слоями мышечной оболочки. Ганглии имели округлую, овальную или вытянутую форму, состояли из нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток (рис. 13 А, Б, В). Клетки в составе ганглиев не имели четких границ, пространство вокруг них было заполнено слабо эозинофильным нейропилем. В нейропиле встречались очаги разрежения, более выраженные в краевых зонах ганглиев, где иногда они принимали вид щелевидных пространств, отграничивающих ганглии от окружающих тканей. Нейроны в ганглиях различались по размеру, и в тех ганглиях, которые были ориентированы продольно, они располагались в одной плоскости. Нейроны имели крупное округлое ядро с рыхлым хроматином, без или с одним-двумя ядрышками. Ядро занимало около половины всей площади клетки. Цитоплазма нейронов характеризовалась базофилией различной степени выраженности. Часть нейронов не имела ядра в плоскости препарата или их ядра были пикнотические. Глиальные клетки, меньшие по размеру, чем нейроны, располагались между ними или на границе ганглиев, их ядро содержало более конденсированный хроматин.



Рис. 12. Ободочная и слепая кишка у мыши контрольной группы. Кишка бледно-розовой окраски с участками сужения и расширения. Нефиксированный макропрепарат

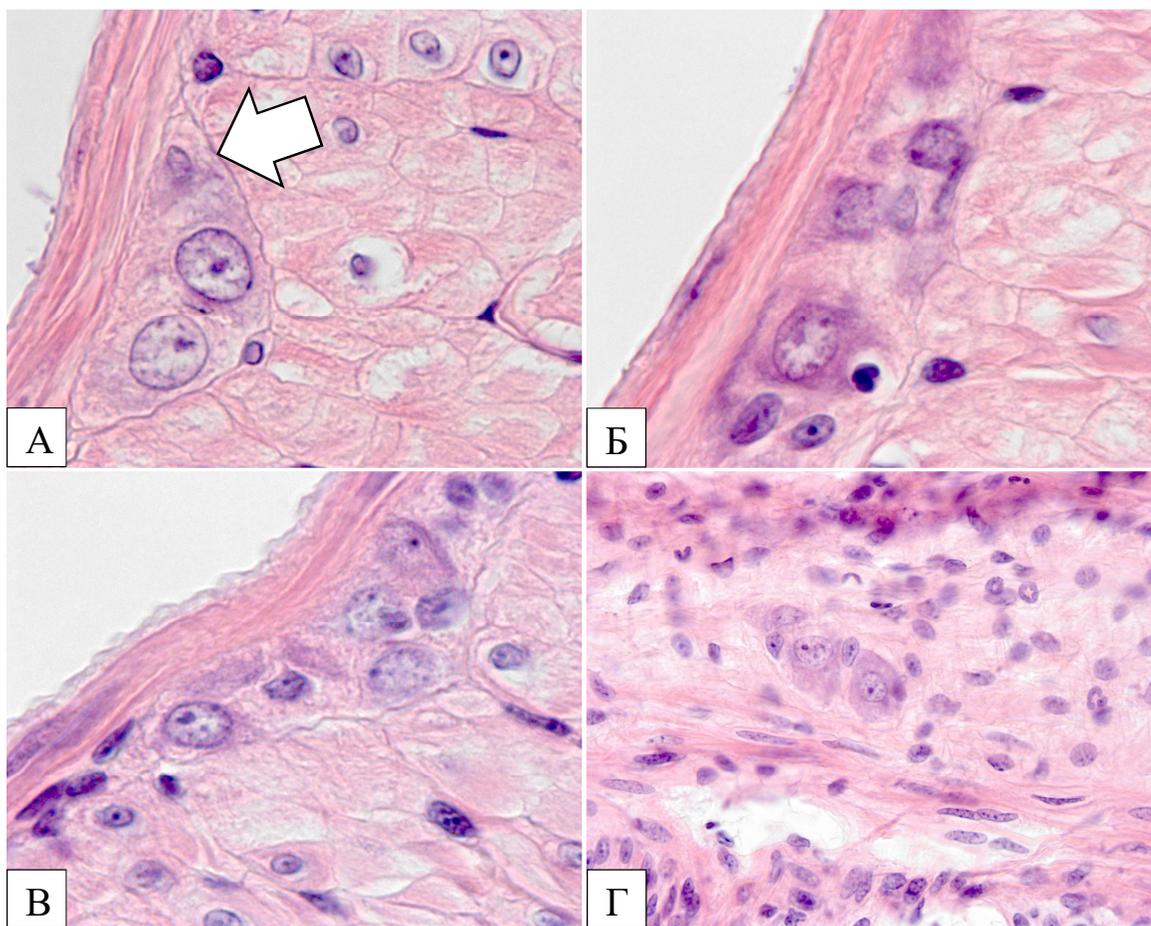


Рис. 13. Энтеральные ганглии ободочной кишки у мышей контрольной группы. А – миентеральный ганглий с двумя нейронами и глиальной клеткой (стрелка); Б – миентеральный ганглий с нейронами и глиальными клетками, прилежащий к ганглию капилляр с лейкоцитом в просвете; В – миентеральный ганглий с несколькими нейронами и глиальными клетками; Г – субмукозный ганглий с нейронами и глиальными клетками. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 640 (А, Б, В), 400 (Г)

Цитоплазма глиальных клеток четко не визуализировалась. В составе ганглиев в небольшом количестве определялись неидентифицируемые клетки с темным, небольшим, округлым или вытянутым ядром.

Ганглии были окружены гладкомышечными клетками, единичными фибробластами и фиброцитами. Каких-либо различий в строении миентеральных ганглиев разных отделов ободочной кишки на качественном уровне при окрашивании гематоксилином и эозином не выявлено.

При окрашивании по методу Ниссля в составе миентеральных ганглиев выявлялись нейроны, глиальные и неидентифицируемые клетки (рис. 14). Границы нейронов и ганглиев были четко различимы, между нейронами располагался слабоокрашенный волокнистый нейропилль. Ядра нейронов были бледно-фиолетового цвета с четкой границей и рыхлым хроматином, без или с одним-двумя ядрышками (центральное сечение). В цитоплазме выявлялась субстанция Ниссля, пылевидная или собранная в глыбчатый тигроид. В одних нейронах субстанция Ниссля была распределена неравномерно, и она концентрировалась парануклеарно в виде ободка с вакуолеобразным разрежением, в других нейронах была распределена диффузно. Цитоплазма нейронов различалась по интенсивности окрашивания, что позволяло их идентифицировать как гипо-, нормо- и гиперхромные нейроны. Ядра чаще всего располагались эксцентрично, ядрышки в них окрашивались равномерно или имели просветление в центре. Некоторые нейроны - пикнотические, имели неровные контуры, резко гиперхромную цитоплазму, деформированное, часто вытянутое небольшое гиперхромное ядро. В ряде нейронов цитоплазма была резко гиперхромной и практически без тигроида. Многие нейроны имели пирамидальную форму. Глиальные клетки характеризовались небольшим светло-голубым ядром - их цитоплазма не имела четких границ с нейропилем. Небольшое количество клеток было невозможно идентифицировать. На качественном уровне, каких-либо различий в клеточном составе миентеральных ганглиев различных отделов при окрашивании по методу Ниссля не выявлено.

При исследовании гистологических препаратов, окрашенных пикросириусом красным, вокруг ганглиев в поляризованном свете, визуализировалась тонкая соединительнотканная капсула (рис. 15 А), имеющая желто-зеленый и красно-оранжевый цвет (рис. 15 Б), что соответствует незрелому и зрелому коллагену. Капсула имела относительно равномерную толщину и переходила в соединительнотканную строму мышечной оболочки.

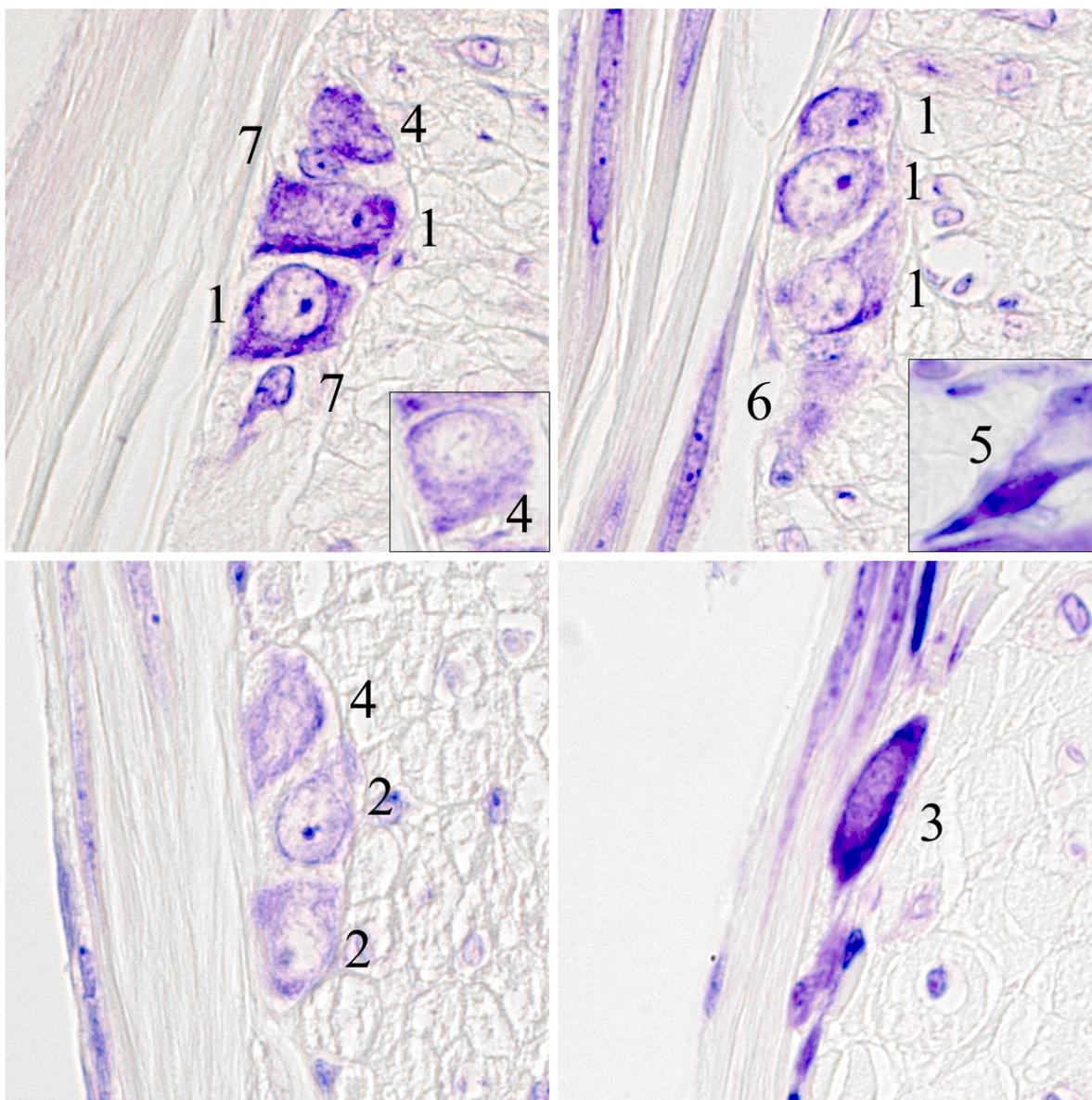


Рис. 14. Миентеральные ганглии ободочной кишки у мышей контрольной группы: 1 – нормохромные нейроны; 2 – гипохромные нейроны; 3 – гиперхромный нейрон; 4 – нейроны с ядром без ядрышка; 5 – пикнотический гиперхромный нейрон; 6 – нейроны без ядра; 7 – глиальные клетки. Окрашивание по методу Ниссля. Ув. 640

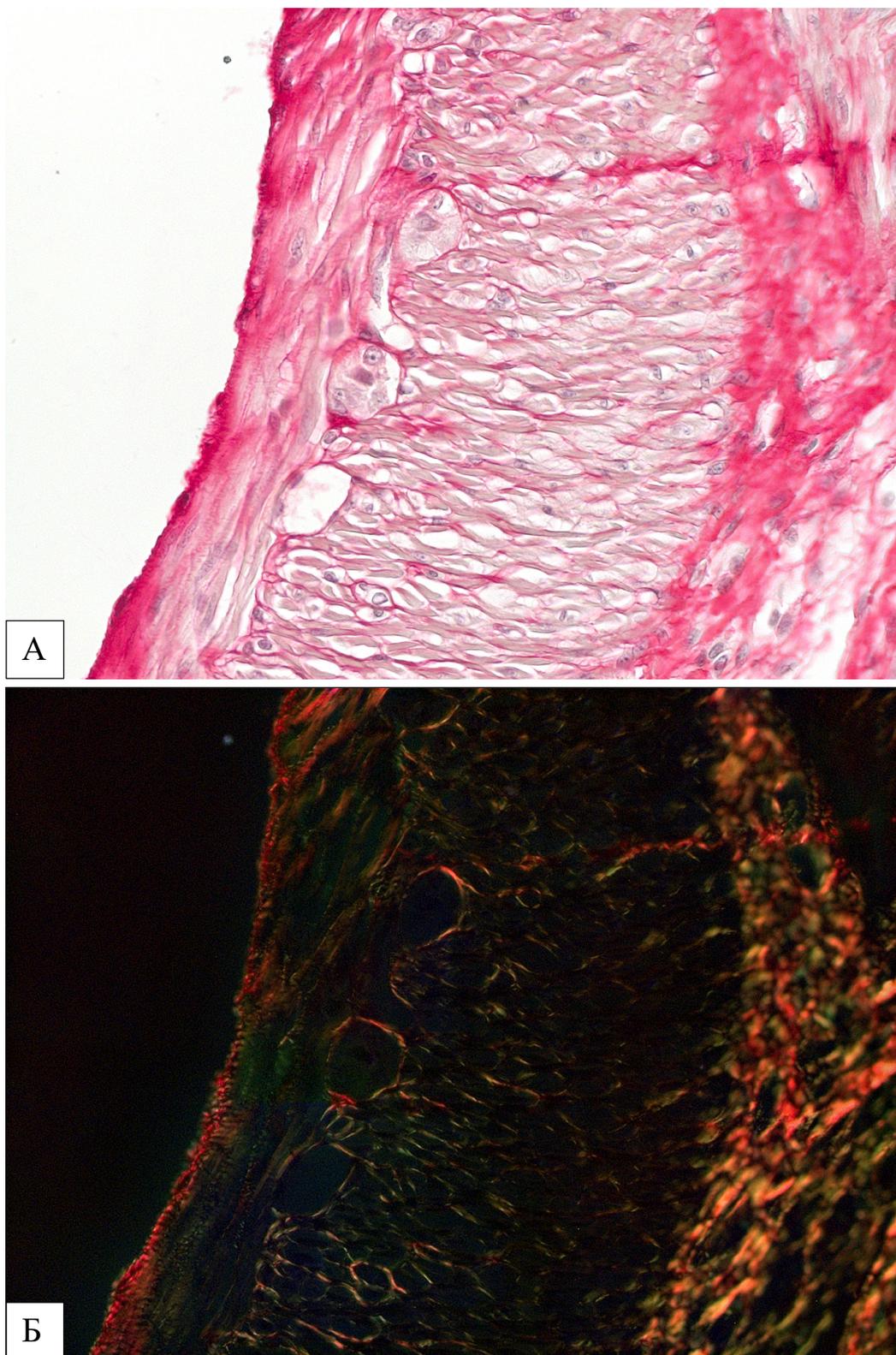


Рис. 15. Соединительнотканная капсула миентеральных ганглиев ободочной кишки у мыши контрольной группы: А – в видимом свете визуализируется соединительная ткань в мышечной оболочке и подслизистой основе. Ганглии окружены тонкой соединительнотканной капсулой; Б - в поляризованном свете периганглионарная соединительная ткань имеет красно-желтый и зеленый цвет. Окрашивание пикросириусом красным. Ув. 400

Морфофункциональная характеристика субмукозного сплетения в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, субмукозное сплетение во всех отделах было представлено ганглиями, компактно расположенными в соединительной ткани подслизистой основы (рис. 13 Г). Их количество было меньше чем миентеральных ганглиев. Субмукозные ганглии имели округлую, реже овальную форму и состояли из 1-3 нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток. В медиальном отделе по сравнению с проксимальным, где они располагались в основании складок, образованных слизистой оболочкой и подслизистой основой, их количество уменьшалось, а в дистальном они были единичными (рис. 16). По морфологической характеристике нейроны и глиальные клетки субмукозных ганглиев не отличались от миентеральных. При окрашивании по методу Ниссля подслизистые ганглии состояли из нейронов, глиальных, неидентифицируемых клеток и нейропиля. При окрашивании пикросириусом красным субмукозные ганглии были окружены толстой соединительнотканной оболочкой, красно-оранжевого цвета в поляризованном свете.

Количественная характеристика энтеральных ганглиев и клеточного состава миентеральных ганглиев в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При подсчете ганглиев на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, в проксимальном отделе количество субмукозных ганглиев на 1 мм длины мышечной оболочки было статистически значимо больше – 0.80 (0.74;0.86), чем в дистальном - 0-1 ганглий на весь препарат. Число миентеральных ганглиев на 1 мм длины мышечной оболочки составила 3.50 (3.42;3.55), различий по отделам по этому показателю не было. Число глиальных клеток превосходило число нейронов центрального сечения, в дистальном отделе количество глиальных клеток было наименьшим (рис. 17, табл. 3).

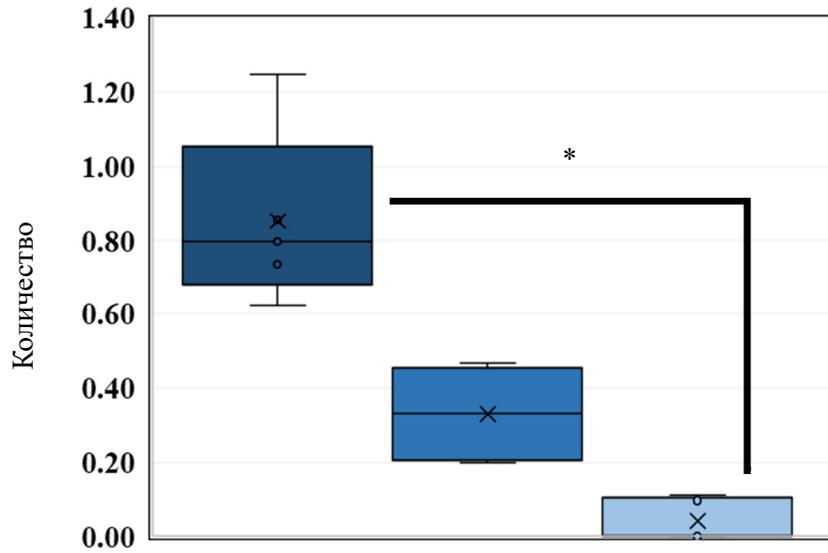


Рис. 16. Количество субмукозных ганглиев на 1 мм длины гистологического среза в разных отделах ободочной кишки,

■ - проксимальный; ■ - медиальный; ■ - дистальный, * - $p < 0.05$

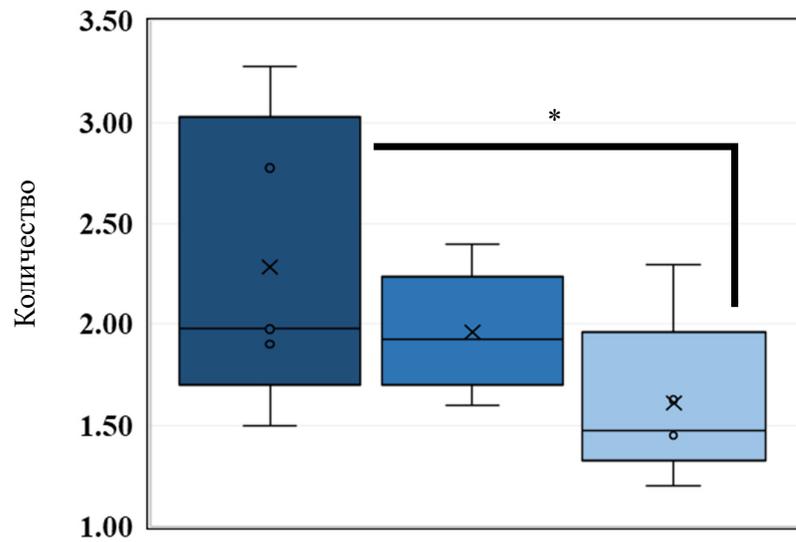


Рис. 17. Количество глиальных клеток на ганглии на гистологических срезах ободочной кишки,

■ - проксимальный; ■ - медиальный; ■ - дистальный, * - $p < 0.05$

Таблица 3

Клеточный состав на ганглий миентеральных ганглиев в различных отделах ободочной кишки у мышей C57BL/6, Me (25L;75U)

Показатели кол-ва на ганглий, Клетки	Отделы		
	Проксимальный	Медиальный	Дистальный
Нормохромные нейроны	0.50 (0.50;0.58)	0.50 (0.48;0.55)	0.70 (0.68;0.88)
Гипохромные нейроны	0.40 (0.40;0.45)	0.38 (0.38;0.58)	0.43 (0.40;0.48)
Гиперхромные нейроны	0.10 (0.05;0.10)	0.10 (0.05;0.13)	0.08 (0.05;0.08)
Все нейроны центрального сечения	1.00 (0.93;1.08)	1.00 (0.98;1.05)	1.20 (1.15;1.35)
Нейроны без ядрышка	0.25 (0.20;0.50)	0.33 (0.28;0.35)	0.23 (0.13;0.48)
Пикнотические нейроны	0.05 (0.03;0.08)	0.05 (0.05;0.08)	0.10 (0.05;0.13)
Нормохромные нейроны без ядра	1.40 (1.10;1.88)	1.38 (0.75;1.45)	1.05 (0.85;1,05)
Глиальные клетки	1.98 (1.90;2.78)* (с дистальным)	1.93 (1.80;2.08)	1.48 (1.45;1.63)* (с проксимальным)
Нейрон-глиальное отношение	0.49 (0.39;0.52)* (с дистальным)	0.54 (0.48;0.57)	0.71 (0.58;1.13)* (с проксимальным)

* - Статистически значимые различия между отделами, тест Краскела-Уоллиса, $p < 0.05$

При цитометрическом исследовании нейроны центрального сечения различались по размеру цитоплазмы и, в меньшей степени, ядра. Между различными отделами ободочной кишки не выявлено статистически значимых различий по размеру цитоплазмы, ядра и ядерно-цитоплазматическому индексу.

Морфологическая характеристика миентерального сплетения дистального отдела ободочной кишки на гистологических препаратах, маркированных антителами к β III-тубулину и S100b, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

Проводили ИГХ исследование продольных срезов дистального отдела ободочной кишки с использованием антител к β III-тубулину и S100b. Между продольным и циркулярным слоями мышечной оболочки прослеживалось множество β III-тубулин-положительных миентеральных ганглиев разного размера, а в подслизистом слое - 1-2 субмукозных ганглия на протяжении всего дистального отдела ободочной кишки. Миентеральные ганглии образовывали цепочку, имели округлую или вытянутую форму, а субмукозные ганглии были преимущественно округлые (рис. 18 А). Ганглии окрашивались неравномерно – в области ядер нейронов отмечалось выраженное отложение продукта реакции, в некоторых ганглиях края окрашивались интенсивнее с образованием ободка, в других ганглиях интенсивнее окрашивалась центральная зона. Нейропиль в ганглиях имел волокнистое строение. Нервные волокна в циркулярном слое мышечной оболочки различались по диаметру, имели овальную, продолговатую или извитую форму и также характеризовались волокнистым строением (рис. 19 А). Часть нервных волокон выходила из ганглиев и пересекала мышечную оболочку, большинство волокон было ориентировано фронтально по отношению к плоскости среза препарата. Волокна имели преимущественно четкие контуры и различались по выраженности окрашивания, как правило волокна более крупных размеров окрашивались интенсивнее. В продольном слое мышечной оболочки количество нервных волокон было значительно меньше, чем в циркулярном, и они имели меньший диаметр, в серозной оболочке они не выявлялись. На границе мышечной оболочки и подслизистой основы многочисленные нервные волокна лежали в одной плоскости, не переходя, однако, в подслизистую основу.

S100b-положительные структуры в мышечной оболочке ободочной кишки локализовались там же, где и β III-тубулин-позитивные (рис. 18 Б, 20 А). Они отличались менее интенсивным окрашиванием и меньшими размерами. В ганглиях, маркированных антителами к S100b, обнаруживались слабо окрашенные тела нейронов, интенсивно окрашенный нейропиль, имеющий характерное волокнистое строение и разреженные пространства. В ганглиях интенсивно окрашивались тела глиальных клеток.

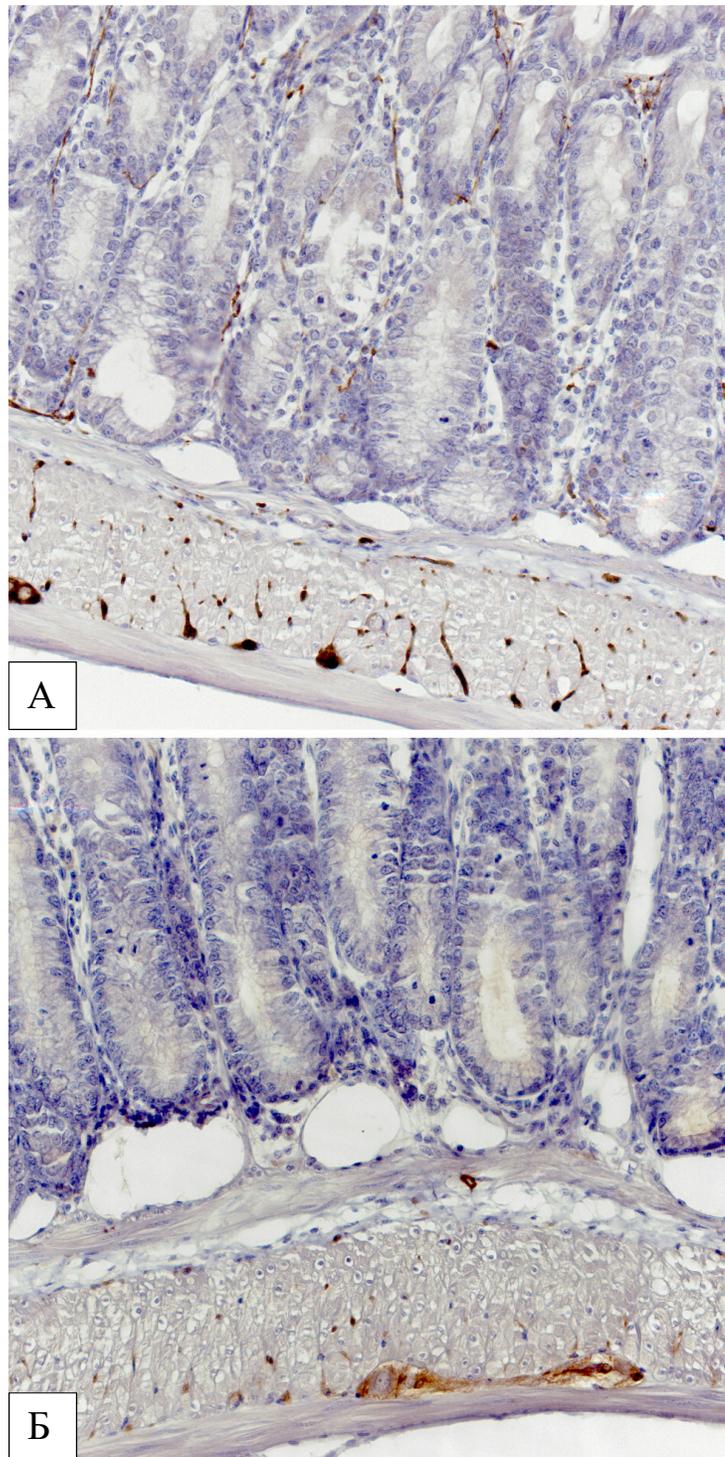


Рис. 18. Нервные волокна и S100b-положительные клетки в мышечной оболочке и СПСО дистального отдела ободочной кишки у мышей контрольной группы. А – ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. В мышечной оболочке визуализируются нервные отростки различного диаметра и формы и миентеральные ганглии с плотным нейропилем. В слизистой оболочке в пространствах между криптами локализованы нервные отростки; Б - ИГХ окрашивание с использованием антител к S100b. Тела и отростки глиальных клеток образуют нейропиле миентеральных ганглиев, а также выявляются в мышечной оболочке. Докрашивание структур гематоксилином Майера. Ув. 200

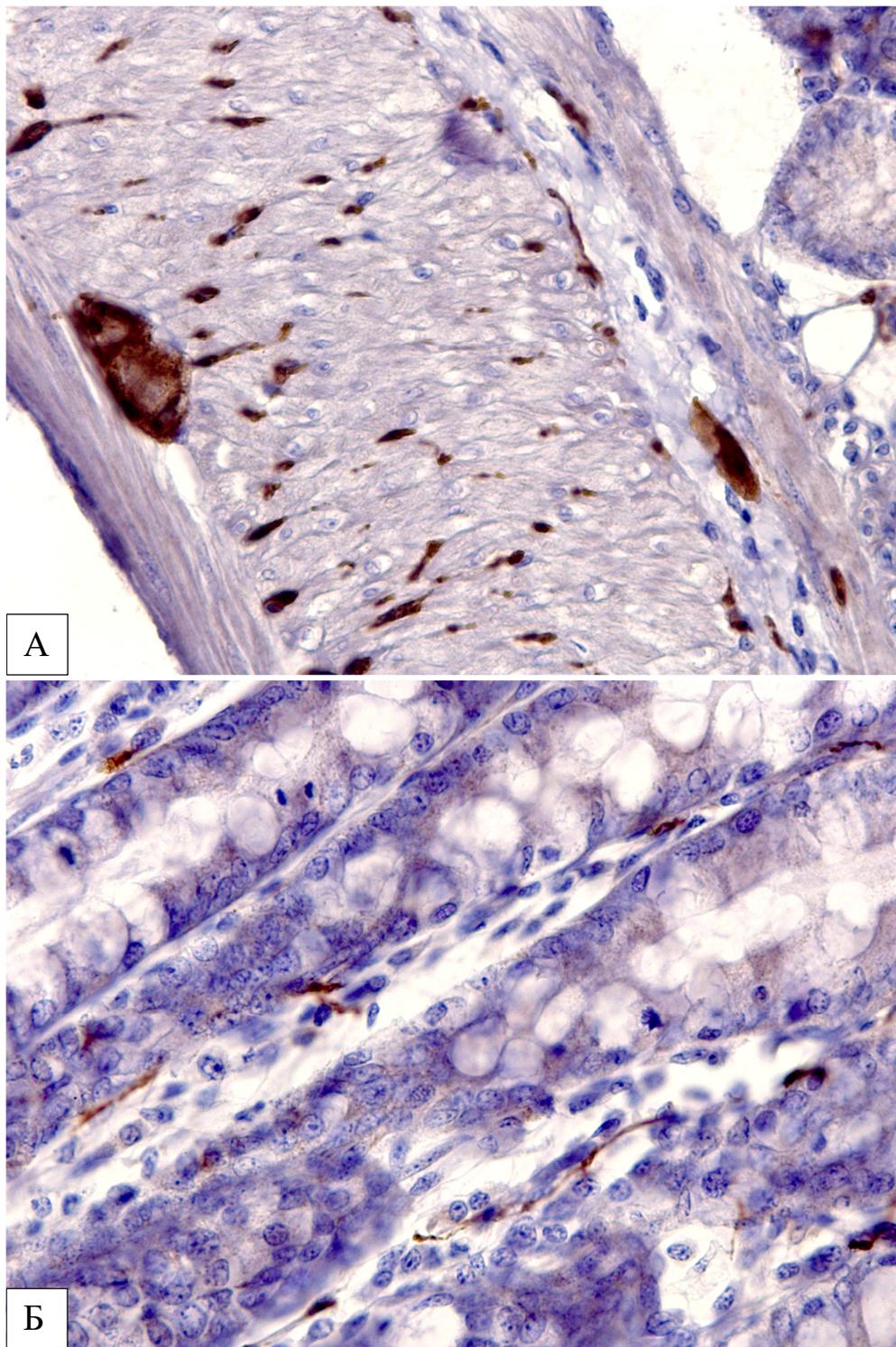


Рис. 19. Нервные волокна в мышечной оболочке (А) и СПСО (Б) дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы. А – нервные волокна имеют вид округлых, овальных или продолговатых профилей различного диаметра, расположенных по ходу циркулярного слоя мышечной оболочки, часть из них ориентирована тангенциально относительно плоскости среза препарата; Б – нервные волокна в СПСО располагаются в пространствах между криптами. ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

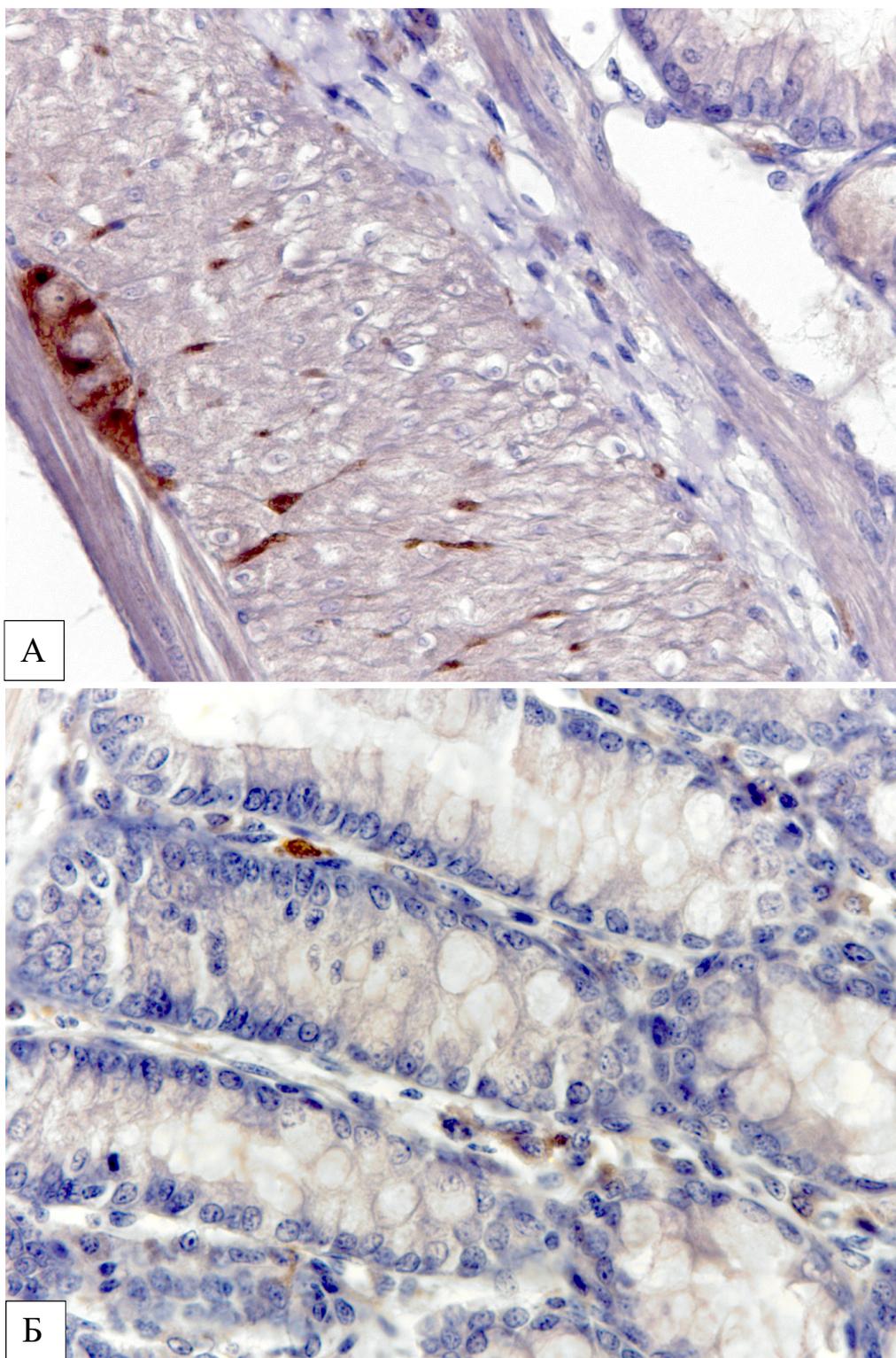


Рис. 20. Глиальные клетки и их отростки в мышечной оболочке (А) и S100b-позитивные клетки в СПСО (Б) дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы. А – глиальные клетки и их отростки в составе миентеральных ганглиев и в толще мышечной оболочки; Б - в СПСО обнаруживаются отдельные S100b-позитивные клетки с различной интенсивностью окрашивания цитоплазмы. ИГХ окрашивание с использованием антител к S100b. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

Морфологическая характеристика субмукозного сплетения дистального отдела ободочной кишки на гистологических препаратах, маркированных антителами к β III-тубулину и S100b, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

В подслизистой основе выявлялось небольшое число неравномерно расположенных β III-тубулин-позитивных волокон. В СПСО нервных волокон было больше, чем в подслизистой основе, большинство из них пронизывало слизистую оболочку, располагаясь в соединительной ткани между криптами, сопровождая и окружая их (рис. 18 А, 19 Б). Они контактировали с эпителиоцитами и другими клетками слизистой оболочки. Некоторые нервные волокна обильно ветвились. Их количество было больше в поверхностных отделах крипт, чем в основании.

S100b-позитивные волокна в подслизистой основе представлены в минимальном количестве. В СПСО выявлялись клетки с S100b-иммунореактивной цитоплазмой (рис. 20 Б). Интенсивность их окрашивания варьировала от слабой до умеренной. Они локализовались преимущественно в соединительной ткани между криптами на некотором отдалении от эпителия и характеризовались небольшим ядром с конденсированным хроматином. В слизистой оболочке S100b-позитивные клетки были значительно тоньше и менее интенсивно окрашены, чем β III-тубулин-положительные волокна.

Иммунофлуоресцентное исследование миентерального и субмукозного сплетений на гистологических препаратах дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами к S100b и HuC/D, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При ИФ исследовании с использованием антител к S100b и HuC/D у мышей контрольной группы в миентеральных ганглиях визуализировались дискретные тела нейронов, маркированные желто-оранжевой флуоресцентной меткой Alexa Fluor 555, и глиальные клетки и их отростки, маркированные зеленой флуоресцентной меткой FITC, формирующие нейропиль. Нейроны различались по размерам и форме, большинство из них имели полигональную или пирамидальную форму (рис. 21 А, Б, В). Ядра нейронов, окрашенные ядерным красителем DAPI в синий цвет, располагались эксцентрически и содержали рыхлый хроматин и 1-2 ядрышка, в их области было отмечено уменьшение интенсивности красной ИФ. Нейропиль имел волокнистое строение с участками разрежения и уплотнения. В области тел глиальных клеток отмечалось усиление интенсивности ИФ. Наибольшая интенсивность ИФ отмечалась в области ядер глиальных клеток, где выявлялась выраженная колокализация S100b и ядерного красителя DAPI, придающая области ядра сине-зеленый цвет.

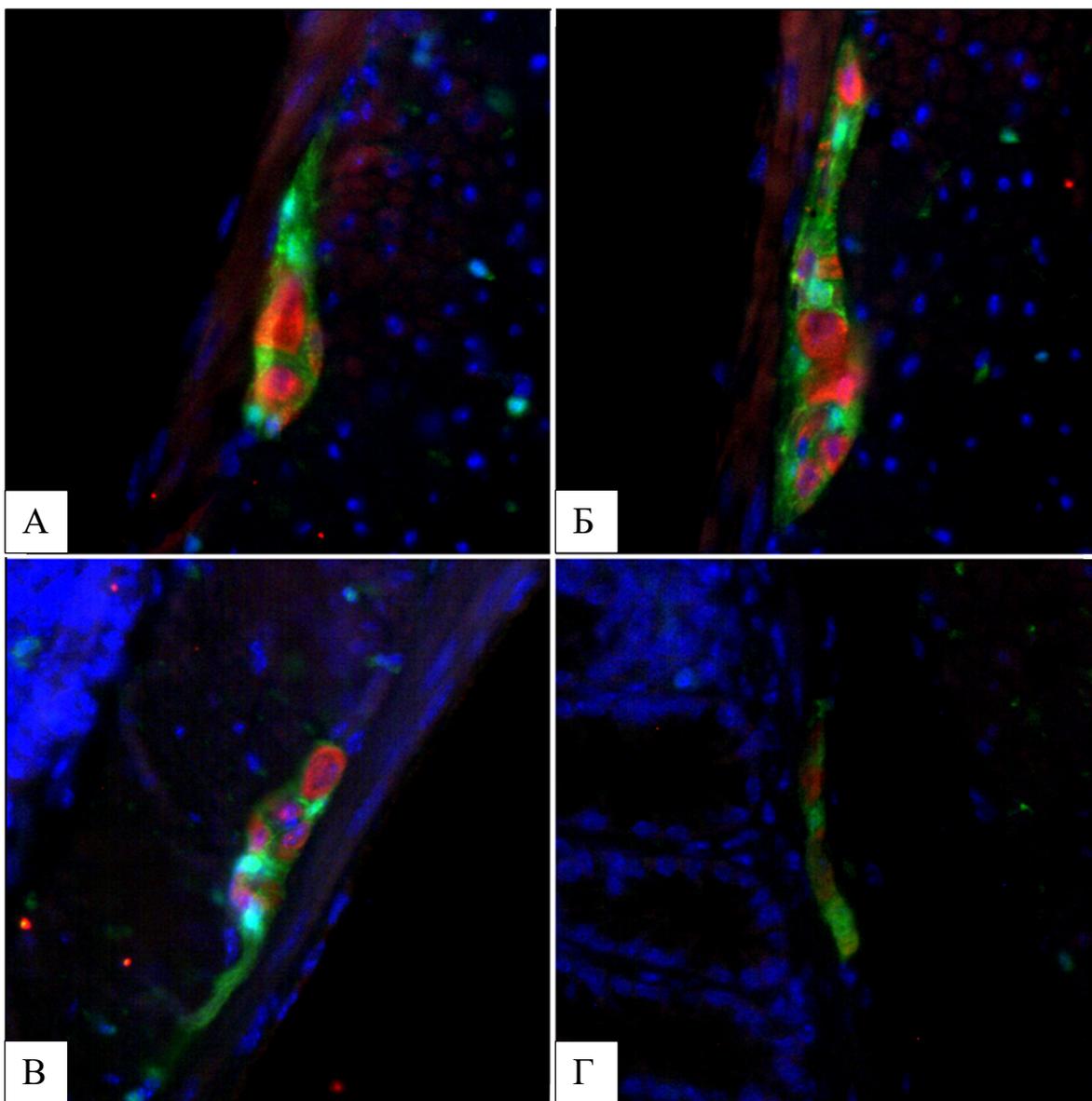


Рис. 21. Миентеральные (А, Б, В) и субмукозный (Г) ганглии дистального отдела ободочной кишки у мышей, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к глиальному маркеру S100b и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В составе ганглиев визуализируются тела нейронов различной формы с просветлением в области ядра, умеренно окрашенный нейропил и интенсивно окрашенные тела глиальных клеток. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

Участки колокализация HuC/D и S100b, имеющие зелено-желтый цвет, располагались в области контакта нейронов и глиальных клеток. Клетки, содержащие оба маркера, в миентеральных ганглиях не выявлялись. На ИФ окрашенных препаратах в миентеральных ганглиях количество нейронов в 2.7 раз превосходило число глиальных клеток. Часть ганглиев содержала тела нейронов, глиальные клетки и нейропилль, другая - только глиальные клетки и нейропилль. В циркулярном слое мышечной оболочки визуализировались отростки глиальных клеток, имеющие чаще всего вид округлых профилей. Крупные S100b-позитивные волокна имели волокнистый вид, в мышечной оболочке также встречались тела внутримышечных глиальных клеток с колокализацией интенсивного зеленого и синего флуоресцентного свечения. Субмукозные нейроны по размеру были меньше, чем миентеральные и содержали 1-2 глиальные клетки (рис. 21 Г).

Иммунофлуоресцентное исследование миентерального и субмукозного сплетений на гистологических препаратах дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами к HuC/D и nNOS, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При ИФ исследовании с использованием антител к nNOS и HuC/D в миентеральных ганглиях выявлялись нейроны, в которых были колокализированы оба маркера (рис. 22 А, Б, В). Свечение маркера nNOS распределено равномерно в телах и отростках нейронов, в области ядра оно было слабее (рис. 23). Нитрергические нейроны не отличались от других нейронов по размеру и форме. В миентеральных ганглиях доля нитрергических нейронов составляла 27.5%. Отростки нитрергических нейронов формировали в нейропиле волокнистые структуры. Вне ганглиев nNOS-положительные волокна локализовались в циркулярном слое мышечной оболочки и имели вид округлых профилей. В субмукозных ганглиях встречались единичные nNOS-положительные нейроны (рис. 22 Г). Интенсивность свечения нейропиля в них была меньше чем в миентеральных ганглиях.

Иммунофлуоресцентное исследование нейронов миентерального и субмукозного сплетений на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами к HuC/D и каспазе-3, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При использовании маркера апоптоза каспазы-3 в цитоплазме миентеральных нейронов выявлялась мелкая рассеянная гранулярность (рис. 24 А, Б, В). В большинстве нейронов количество гранул было незначительное, но в отдельных нейронах они заполняли перинуклеарное пространство, образуя ободок вокруг ядра (рис. 25). Нейроны с тотальным свечением цитоплазмы отсутствовали. В нейропиле в небольшом количестве встречались каспаза-3-положительные гранулы. В субмукозных ганглиях каспаза-3-позитивные гранулы были единичными (рис. 24, Г).

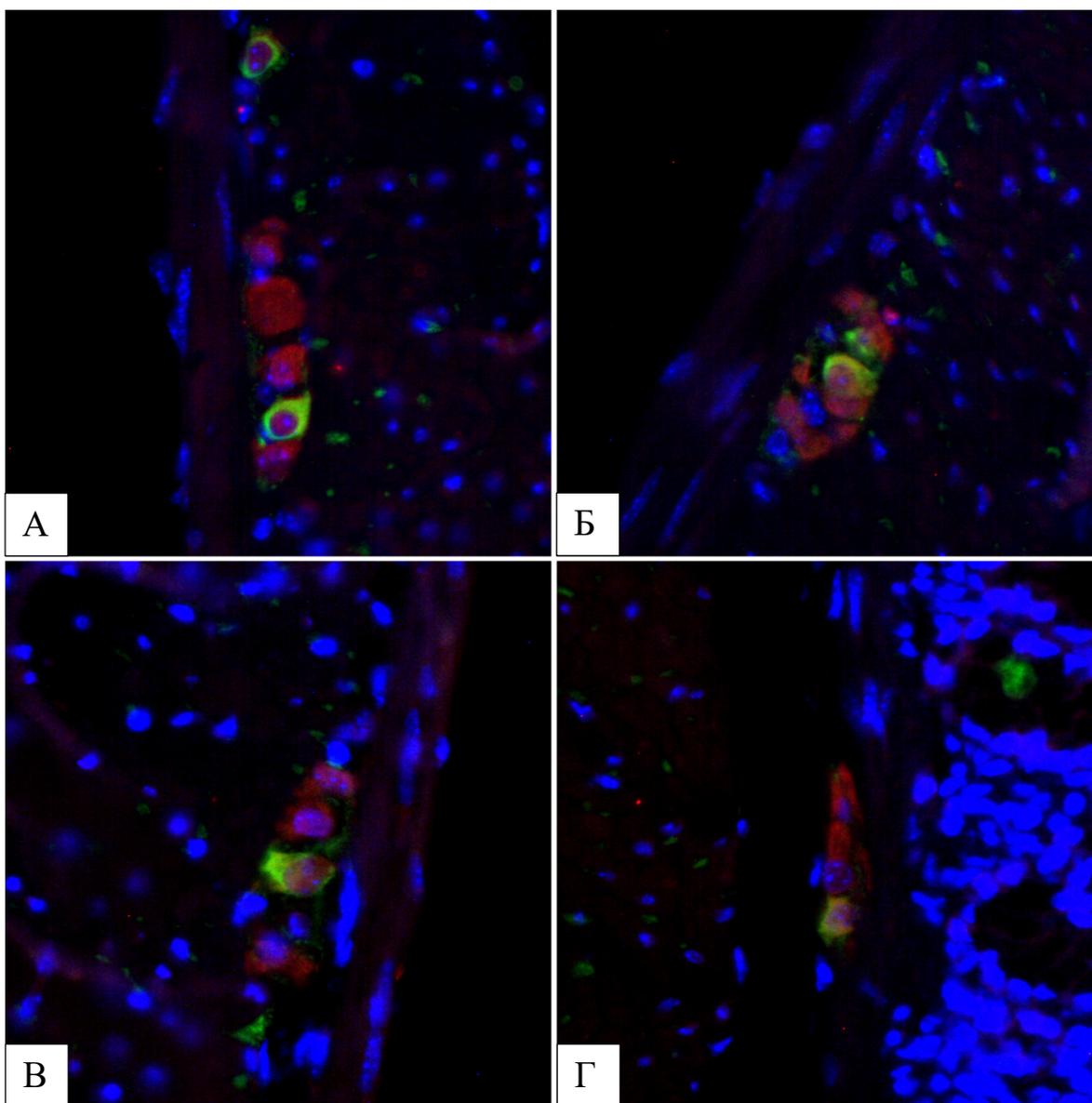


Рис. 22. Миентеральные (А, Б, В) и субмукозные (Г) ганглии дистального отдела ободочной кишки у мышей C57Bl/6, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к маркеру нитергических нейронов pNOS и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). Часть нейронов характеризуется выраженной колокализацией паннейронального маркера и маркера нитергических нейронов, что придает этим нейронам светло-зеленый оттенок. Отростки нитергических нейронов в умеренном количестве выявляются в нейропиле и в небольшом количестве в мышечной оболочке. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

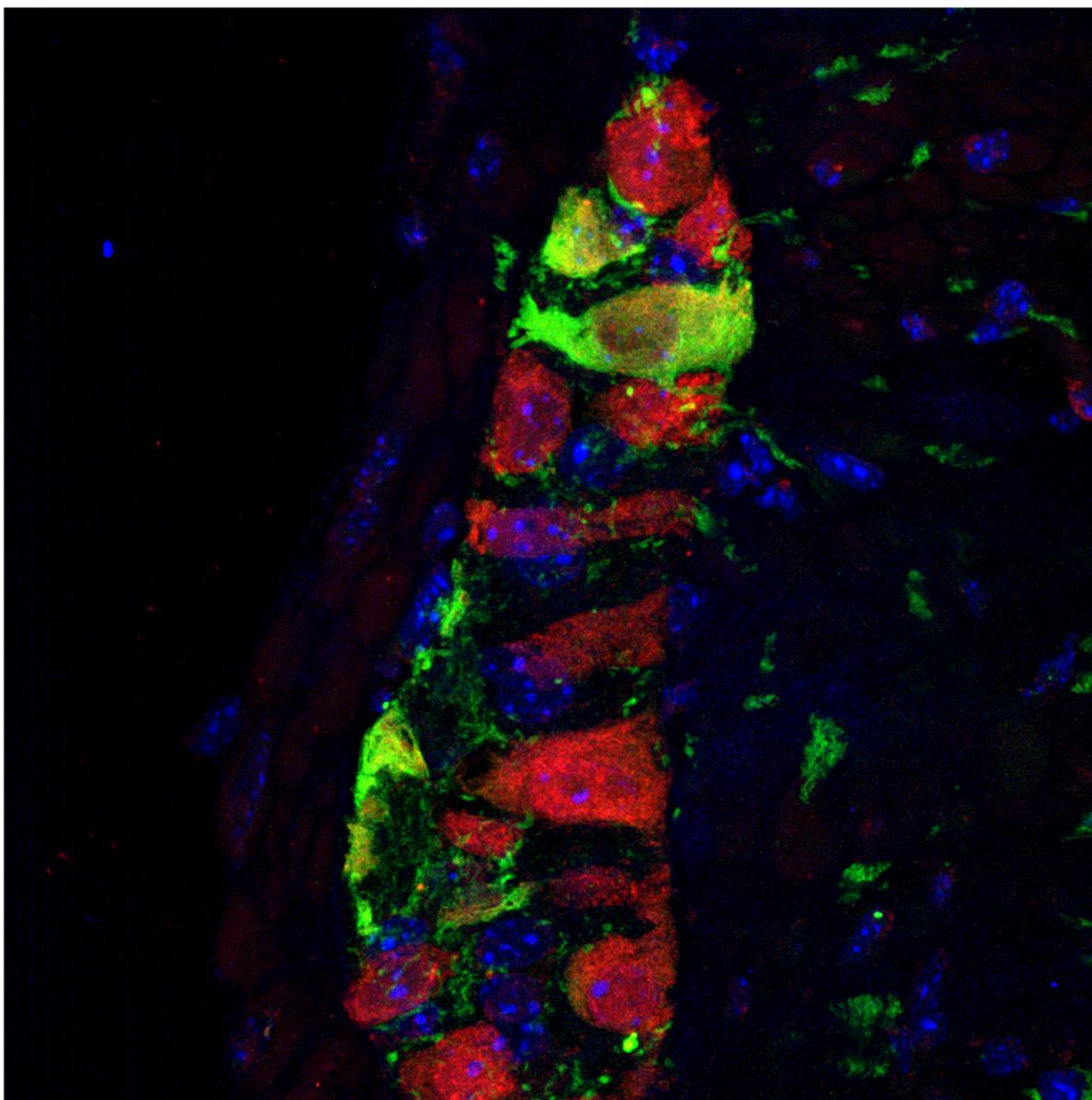


Рис. 23. Миентеральный ганглий дистального отдела ободочной кишки у мыши, маркированный антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к маркеру нитергических нейронов pNOS и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В миентеральном ганглии располагаются нитергические нейроны. В нейропиле и окружающей мышечной оболочке выявляются нитергические нервные волокна. Гистологические срезы, конфокальная микроскопия. Ув. 640

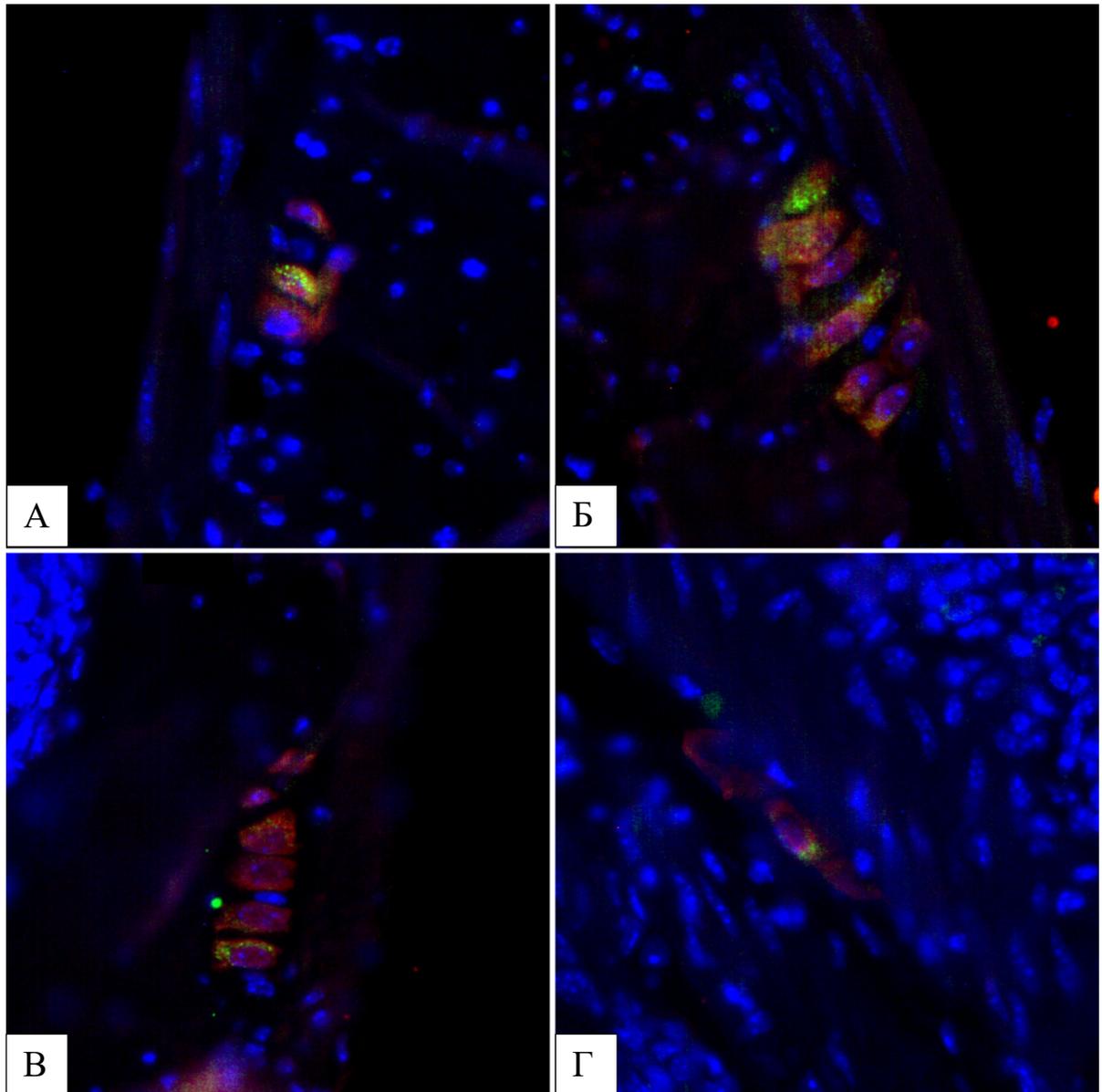


Рис. 24. Миентеральные (А, Б, В) и субмукозные (Г) ганглии дистального отдела ободочной кишки у мышей, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к маркеру апоптоза каспаза-3 и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение) мышей контрольной группы. В цитоплазме нейронов выявляются гранулы разного размера с интенсивным зеленым свечением. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

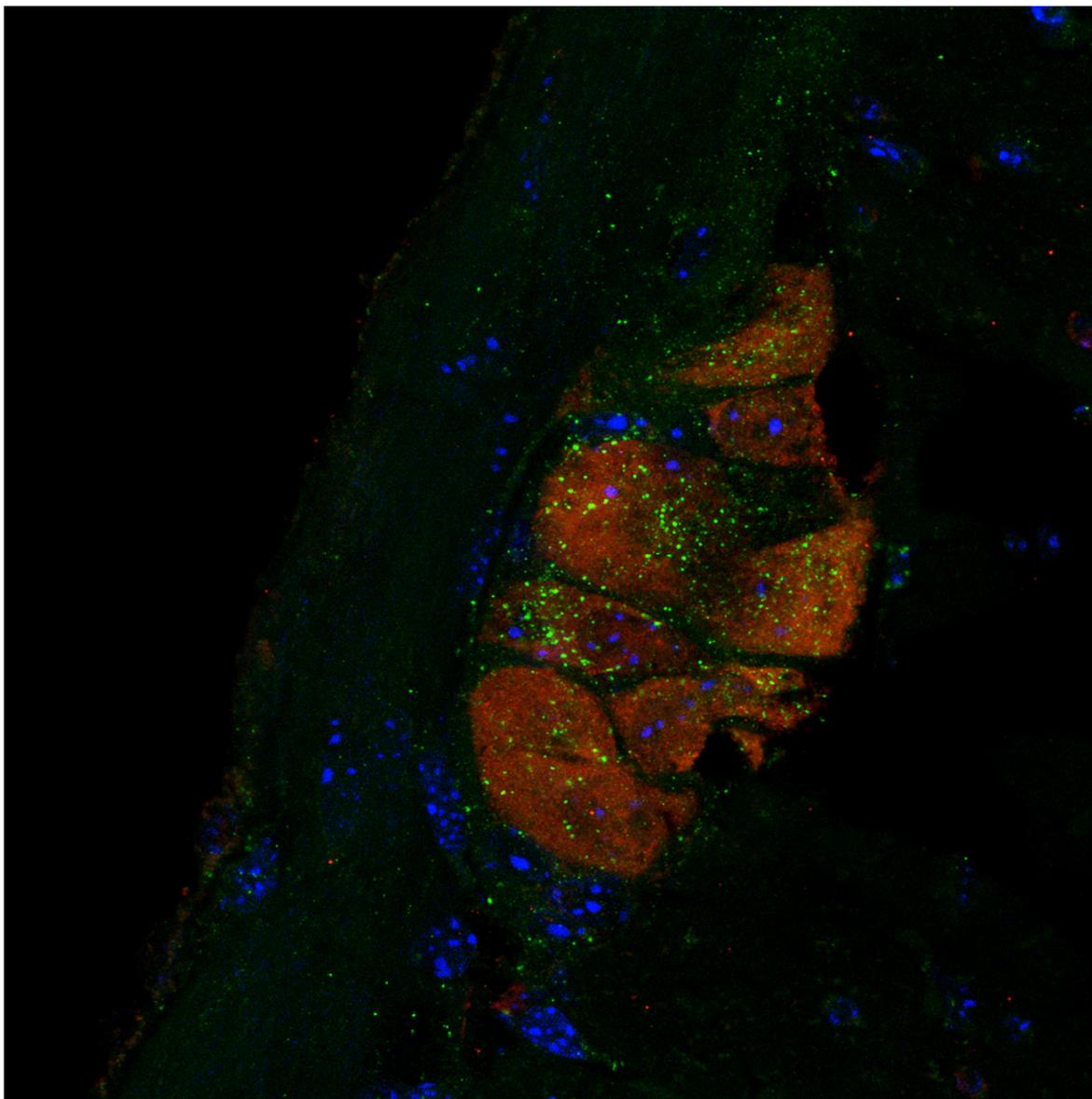


Рис. 25. Миентеральный ганглий дистального отдела ободочной кишки у мыши, маркированный антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к маркеру апоптоза каспазе-3 и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В цитоплазме нейронов гранулы каспазы-3 располагаются преимущественно перинуклеарно. В небольшой части нейронов гранулы заполняют практически всю цитоплазму. Продольные гистологические срезы, конфокальная микроскопия. Ув. 640

Иммунофлуоресцентное исследование миентеральных и субмукозных ганглиев на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами к NuC/D и Ki67, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При исследовании с использованием маркера клеточной пролиферации Ki67 в составе ганглиев Ki67-позитивные клетки не выявлялись, также не обнаружено колокализации NuC/D и Ki67 (рис. 26 А). В качестве позитивного внутреннего контроля оценивали свечение клеток в базальных отделах крипт, где определялись отдельные клетки с Ki67-положительным ядром (рис. 26 Б).

Гистоархитектоника миентерального и субмукозного сплетений на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами к β III-тубулину, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

С целью характеристики гистоархитектоники миентерального сплетения было проведено ИФ исследование тотальных препаратов дистального отдела ободочной кишки с использованием антител к паннейрональному маркеру β III-тубулину.

При использовании антител к β III-тубулину иммунореактивные структуры выявлялись как в составе энтеральных ганглиев, так и вне их. Миентеральное сплетение было представлено миентеральными ганглиями и нервными трактами, межганглионарными (рис. 27 А), и внутримышечными нервными волокнами (рис. 27 Б) разного диаметра. Ганглии были ориентированы в одной плоскости, формировали сеть и соединялись нервными трактами, состоящими из множества идущих параллельно нервных волокон. Крупные ганглии располагались параллельно циркулярному слою мышечной оболочки и перпендикулярно по отношению к нервным трактам. Крупные ганглии имели вытянутую форму, а более мелкие были треугольными, в ганглиях располагались нейроны и нервные волокна, которые продолжались в нервные тракты (рис. 28). Межганглионарные пространства различались по размерам и форме: более крупные были полигональными, более мелкие - округлыми или треугольными (рис. 27 А). Нейроны имели округлую форму и крупное ядро, которое занимало большую часть цитоплазмы (рис. 28). Большая часть нейронов лежала в центре ганглиев, где отмечалось очаговое разрежение нервных волокон, а также на поверхности ганглиев, отдельные нейроны располагались в проекции нервных трактов. Кроме нейронов в ганглиях и нервных трактах выявлялись глиальные клетки, они характеризовались меньшим по размеру ядром чем нейроны и отсутствием очерченных границ клетки. Глиальные клетки располагались между нейронами в ганглиях и выявлялись в нервных трактах между нервными волокнами.

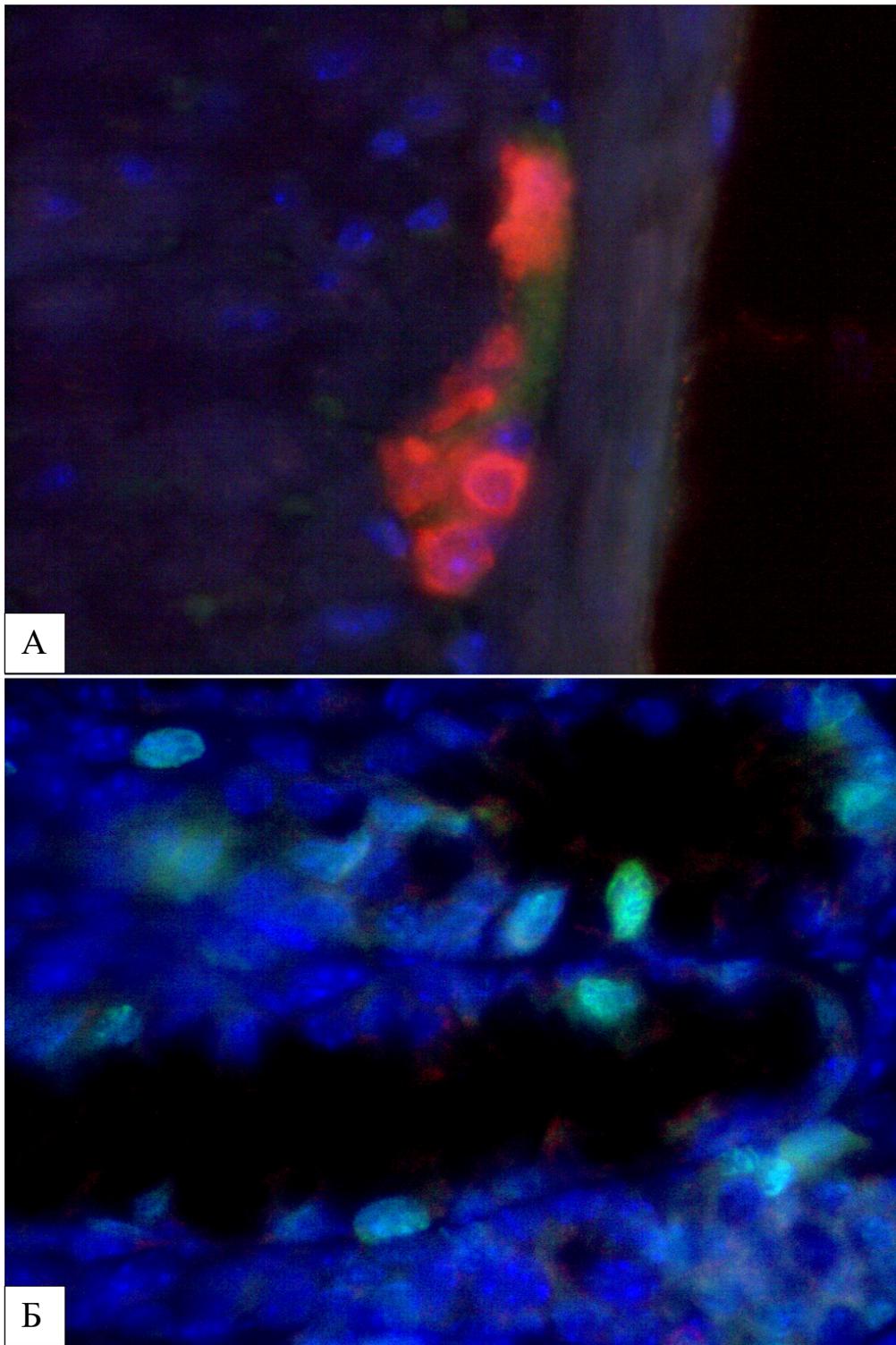


Рис. 26. Миентеральный ганглий (А) и базальный отдел крипты СПСО (Б) дистального отдела ободочной кишки у мыши С57В1/6 в контрольной группе, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), антителами к маркеру пролиферации Ki67 и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В пределах ганглиев пролиферирующие клетки отсутствуют. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 600

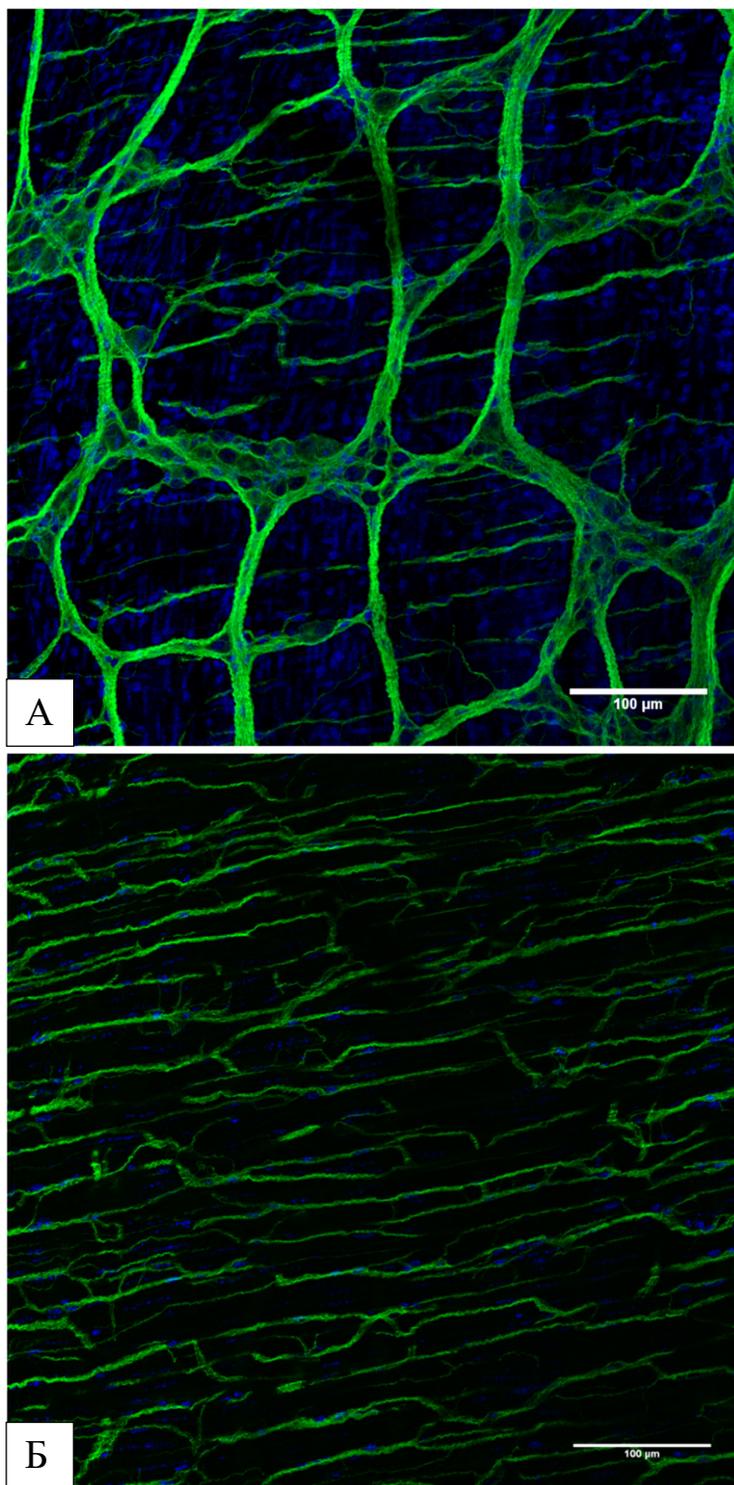


Рис. 27. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мыши, маркированные с использованием антител к β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). А – миентеральные ганглии и нервные тракты. В составе ганглиев выявляются тела и отростки нейронов. Б – нервные волокна в циркулярном слое мышечной оболочки, нервные волокна различного диаметра идут параллельно п отношению к гладким миоцитам. Конфокальная микроскопия

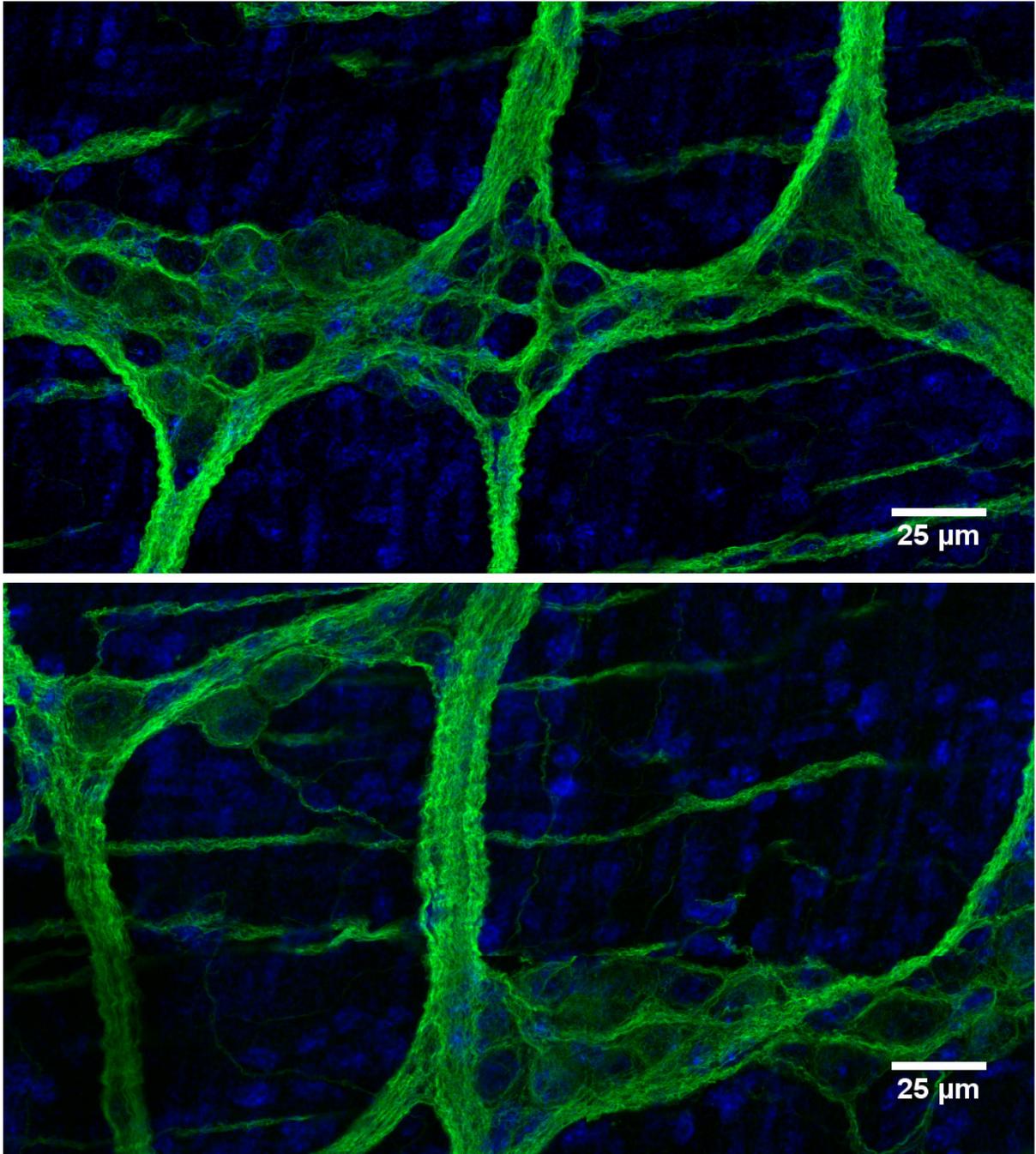


Рис. 28. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мышей, маркированные антителами к β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В составе ганглиев выявляются тела и отростки нейронов, образующие нервные тракты, а также глиальные клетки, отличающиеся меньшим по размеру ядром и отсутствием четко очерченного тела. Конфокальная микроскопия

Многочисленные нервные волокна выходили из ганглиев и нервных трактов в межганглионарные пространства, циркулярный и реже в продольный слой мышечной оболочки, они различались по толщине. Самые тонкие волокна формировались путем ветвления более толстых или выходили непосредственно из ганглиев. Волокна располагались перпендикулярно по отношению к циркулярному слою мышечной оболочки, были извитыми и ветвились. На границе циркулярного слоя мышечной оболочки и подслизистого слоя нервные волокна были крупнее и многочисленнее. В продольном слое мышечной оболочки визуализировались тонкие и немногочисленные нервные волокна, которые располагались перпендикулярно циркулярному слою мышечной оболочки.

На тотальных препаратах СПСО нервные волокна располагались в пространстве между криптами (рис. 29 А, Б). Многочисленные нервные волокна выходили из подслизистой основы и формировали тонкую сеть в СПСО, обрамляя крипты. Они ветвились и утончались в поверхностных отделах слизистой оболочки.

Иммунофлуоресцентное исследование нейронов миентерального сплетения на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами HuC/D, у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

С целью характеристики нейронов миентерального сплетения было проведено ИФ исследование тотальных препаратов мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки, маркированных антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и маркеру глиальных клеток S100b.

Нейроны располагались полосовидными кластерами, образуя ганглии, не имеющие четких границ (рис. 30 А, Б). Ганглии были ориентированы параллельно направлению циркулярного слоя мышечной оболочки. Кроме крупных вытянутых ганглиев встречались небольшие треугольной формы, содержащие 1 - 4 нейрона. Вне миентеральных ганглиев нейроны не выявлялись. Нейроны имели округлую, прямоугольную или треугольную форму (рис. 31). Отмечалось равномерное свечение цитоплазмы нейронов и более слабое их ядер. Ядра нейронов были округлыми или реже полигональными и, как правило, занимали большую часть цитоплазмы и располагались эксцентрически. Интенсивность свечения цитоплазмы нейронов и их размеры были переменными.

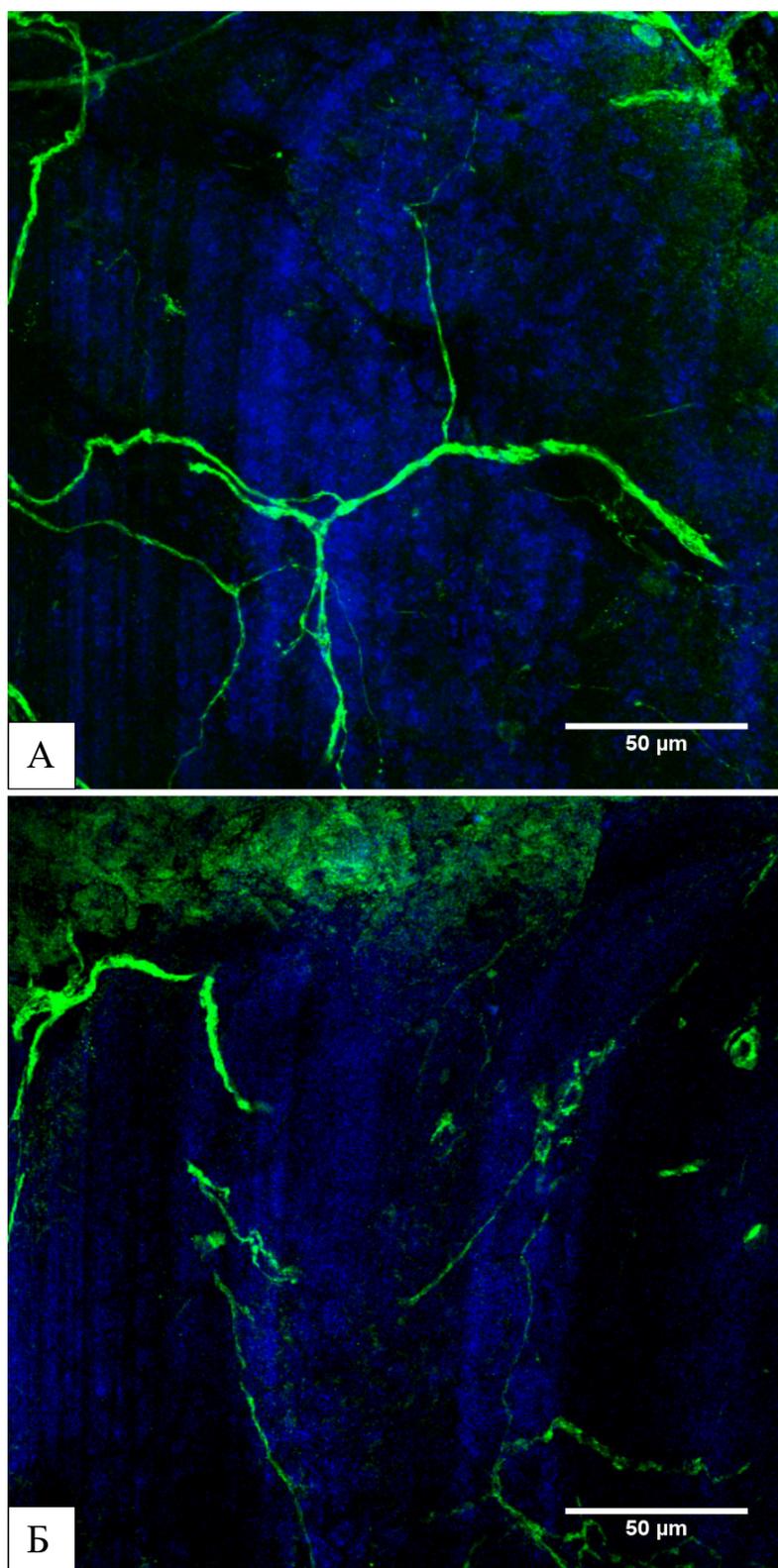


Рис. 29. Тотальные препараты слизистой оболочки дистального отдела ободочной кишки у мышей, маркированные с использованием антител к β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). А – поперечное сечение. Нервные волокна субмукозного сплетения располагаются между криптами; Б – фронтальное сечение. Конфокальная микроскопия

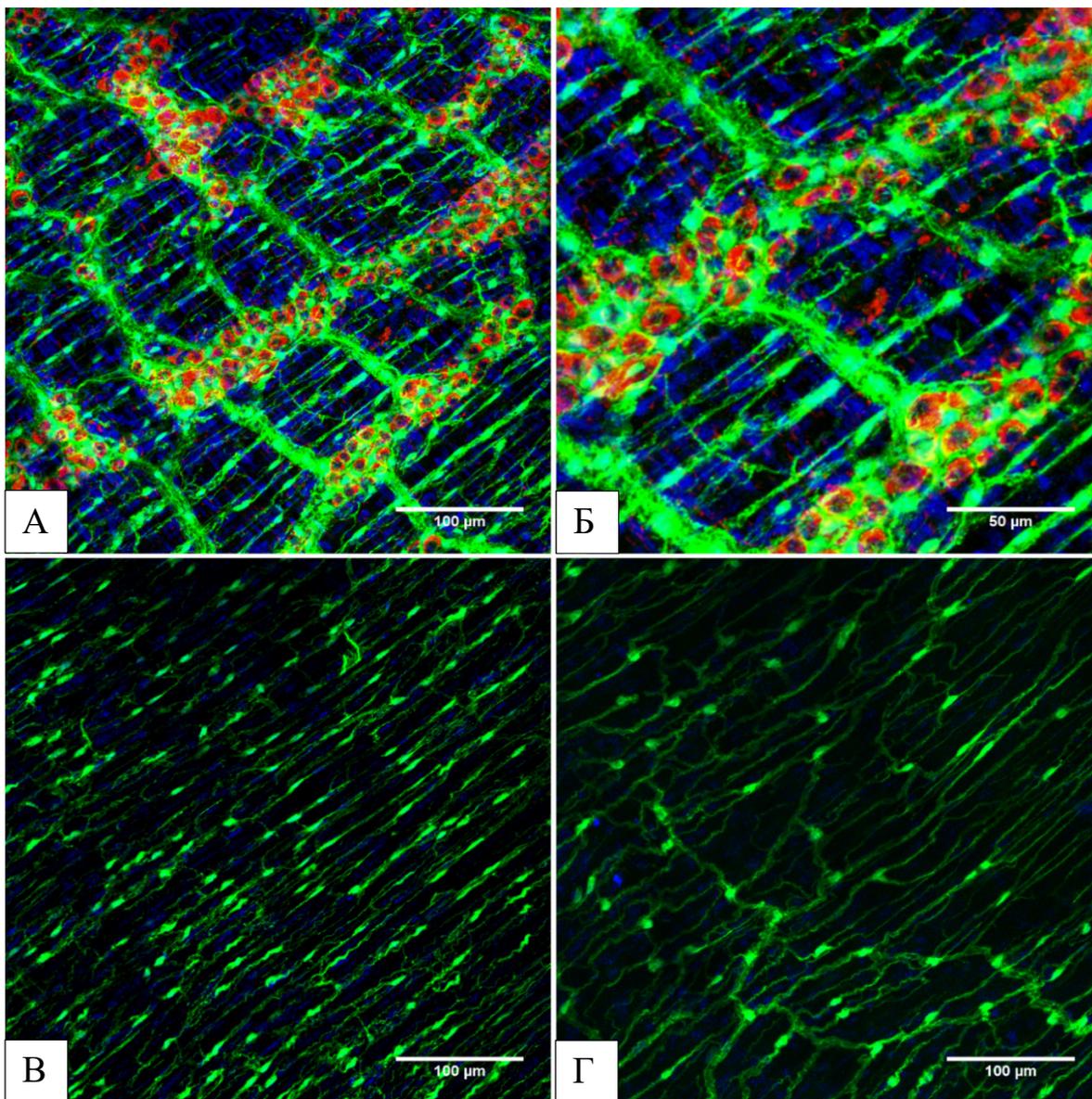


Рис. 30. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мыши в норме, маркированные антителами к S100b и флуорохромом FITC (зеленый), HuC/D и Alexa Fluor 555 (красный) и DAPI (синий). А, Б – миентеральное сплетение. Миентеральное сплетение образовано ганглиями, состоящими из нейронов, тел глиальных клеток и нейропиля. Тела миентеральных нейронов различаются по размерам и форме; В – внутримышечные глиальные клетки, расположенные по ходу нервных волокон; Г – глиальные клетки на границе мышечной оболочки и подслизистой основы. Конфокальная микроскопия

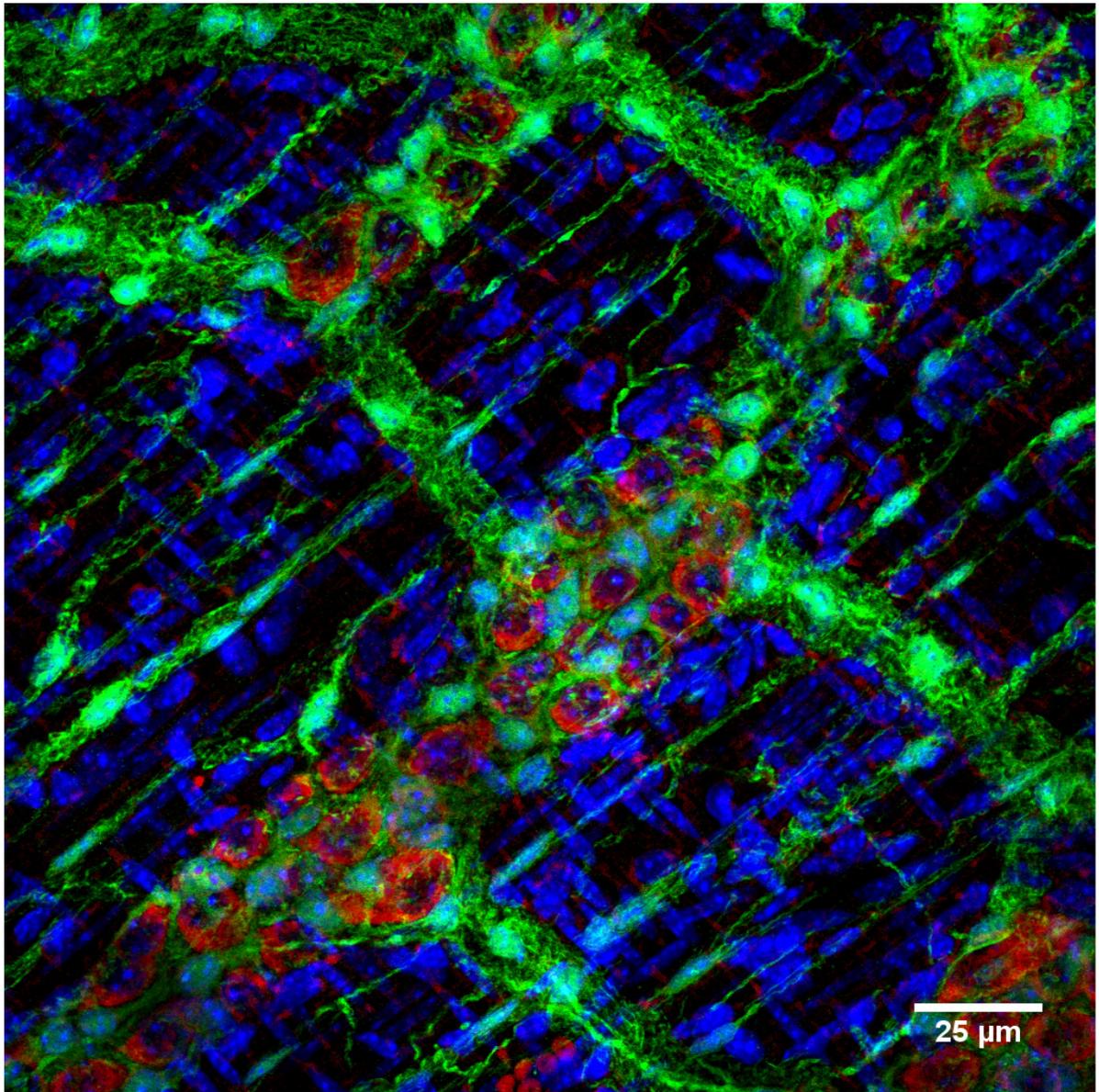


Рис. 31. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мыши в норме, маркированные антителами к S100b и флуорохромом FITC (зеленый), NuC/D и Alexa Fluor 555 (красный) и DAPI (синий). Нейроны окружены нейропилом и телами глиальных клеток. Конфокальная микроскопия

Иммунофлуоресцентное исследование глиальных клеток миентерального сплетения с использованием антител к S100b на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

В составе миентеральных ганглиев и нервных трактов определялись внутриганглионарные и межганглионарные глиальные клетки (рис. 30 А, Б, 31), в пространстве между ганглиями и в циркулярном слое мышечной оболочки внутримышечные глиальные клетки (рис. 30 А В, 31). Глиальные клетки в составе ганглиев образовывали плотный волокнистый нейропил, окружающий тела нейронов (рис. 31). На границе между циркулярным слоем мышечной оболочки и подслизистой основы также визуализировались глиальные клетки (рис. 30 Г). Глиальные клетки имели небольшое, интенсивно светящееся тело преимущественно овальной, треугольной или полигональной формы и отростки, формирующие нейропил, который имел волокнисто-глыбчатое строение и окружал нейроны плотной сетью. Глиальные клетки лежали преимущественно в одной плоскости, образуя непрерывную сеть за счет своих отростков. На тотальных препаратах глиальных клеток было примерно столько же, сколько и нейронов. Внутримышечная глия была локализована в пространствах между ганглиями и в циркулярном слое мышечной оболочки по ходу нервных волокон. Ее клетки характеризовались округлым телом и двумя крупными отростками, идущими параллельно циркулярному слою мышечной оболочки. На границе мышечной оболочки и подслизистой основы располагались глиальные клетки. Они отличались относительно крупным телом и несколькими отростками, расходящимися в разных направлениях.

Ультраструктурная характеристика миентерального и субмукозного сплетений ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

При ультраструктурном исследовании миентеральные ганглии были окружены тонкой капсулой, образованной упорядоченно расположенными коллагеновыми волокнами (рис. 32 В). Ганглии состояли из тел глиальных клеток, нейронов и нейропиля (рис. 32 А, Б, В). Кровеносные сосуды и коллагеновые волокна в пределах ганглиев не выявлялись. В нейронах определялось крупное округлое или овальное ядро с ядрышками, заполненное преимущественно эухроматином. В их цитоплазме визуализировался шероховатый ретикулум, занимавший большую часть цитоплазмы нейронов, гладкий ретикулум и комплекс Гольджи. Многочисленные митохондрии различались по форме и размерам, некоторые были небольшие, округлые или овальные и другие имели вытянутую или извитую форму.

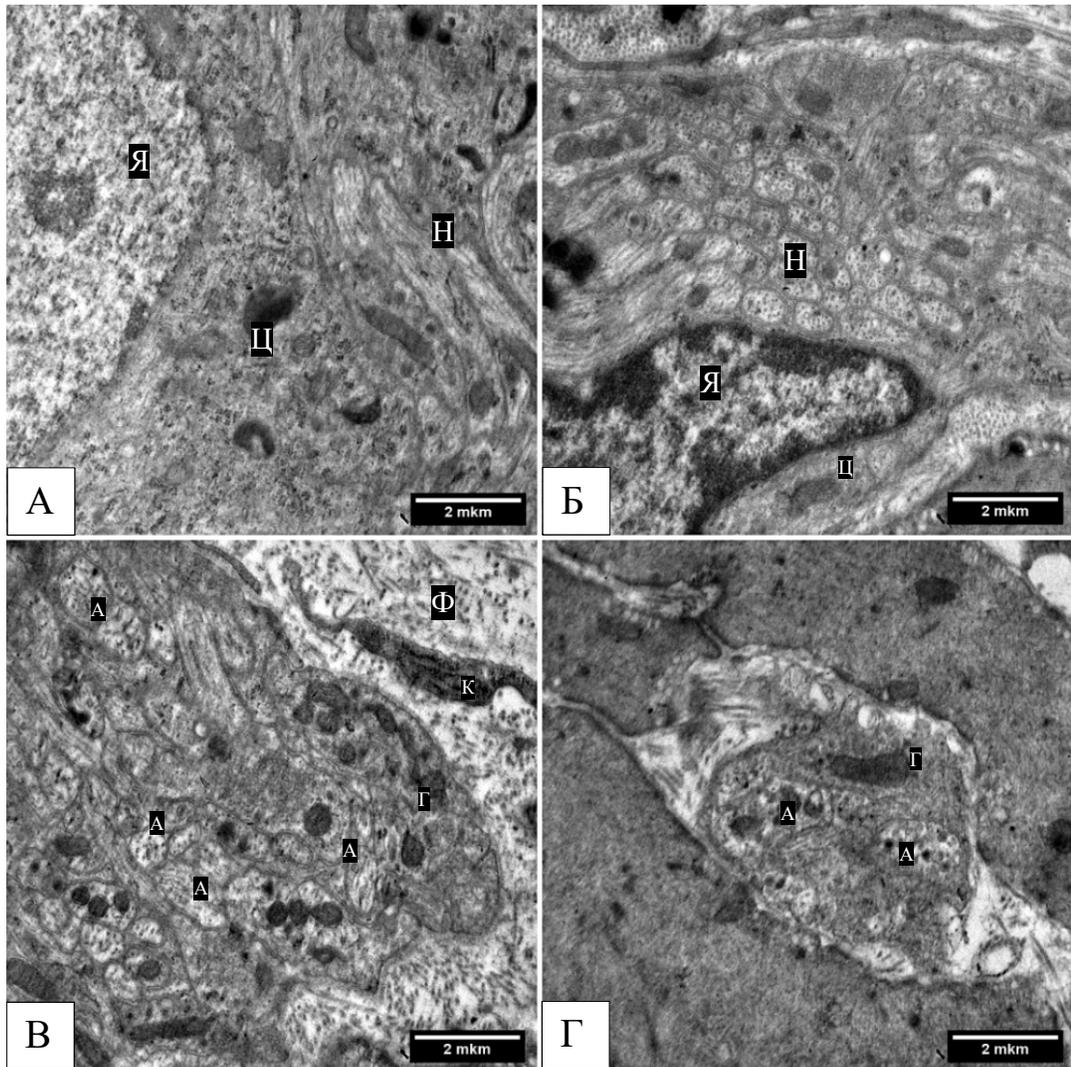


Рис. 32. Ультраструктурное строение миентерального сплетения у мышей. А – ядро (Я) и цитоплазма (Ц) миентерального нейрона. Ядро крупное, округлое, заполнено преимущественно эухроматином, в цитоплазме шероховатый ретикулум. К нейрону прилежит нейропил, образованный профилями отростков нейронов и глиальных клеток (Н); Б – ядро (Я) и цитоплазма (Ц) глиальной клетки. Ядро вытянутое, по сравнению с нейроном в нем больше гетерохроматина. Глиальная клетка окружена нейропилем (Н); В – нейропил миентерального ганглия, образованный округлыми профилями отростков нейронов (А) и глиальных клеток (Г). В отростках нейронов нейрофибриллы, везикулы и митохондрии. Ганглии контактирует с коллагеновыми фибриллами (Ф) и располагающимся в них отростком интерстициальной клетки Кахалы (К); Г – внутримышечное нервное волокно. Строение нейропиля внутримышечного волокна аналогично миентеральным ганглиям. Электронная микроскопия. Ув. 10 000

Глиальные клетки были меньше по размеру чем нейроны, их ядра были полигональными или узурированными и содержали гетерохроматин, концентрирующийся около ядерной мембраны. В цитоплазме глиальных клеток располагались митохондрии, умеренное количество шероховатого и гладкого ретикулума и комплекс Гольджи. Нейропил в ганглиях состоял преимущественно из отростков нейронов и глиальных клеток, небольшого количества межклеточного вещества. Аксоны нейронов в зависимости от ориентации по отношению к плоскости среза имели вид округлых, овальных или вытянутых профилей с четко очерченной плазматической мембраной. В них упорядоченно располагались структурные компоненты цитоскелета - микротрубочки и нейрофиламенты, митохондрии и везикулы различного размера, имеющие округлое или вытянутое очертание, но в отличие от тел нейронов шероховатый ретикулум в них не был представлен. В части волокон везикулы были с электронноплотным содержимым. Отростки глиальных клеток были неправильной формы и лежали между аксонами, охватывая их. На большем протяжении поверхность ганглиев была сформирована глиальными клетками, но в некоторых участках нейроны прилежали непосредственно к коллагеновым волокнам соединительнотканной капсулы. Нервные волокна в мышечной ткани по ультраструктурному строению нейропиля соответствовали миентеральным ганглиям, однако в них отсутствовали тела нейронов, а аксоны имели более упорядоченный ход, формируя на фронтальном сечении сотовые структуры (рис. 32 Г). Их окружали отростки глиальных клеток, в некоторых нервных волокнах встречались их тела.

Нервные волокна в подслизистой основе и СПСО были аналогичны по строению волокнам миентерального сплетения (рис. 33 А, Б). Они были окружены многочисленными коллагеновыми фибриллами (рис. 33 Б). Единичные аксоны в миентеральном и субмукозном сплетении характеризовались дегенерацией и имели вид пустых или заполненных детритом, отграниченных мембранной пространств.

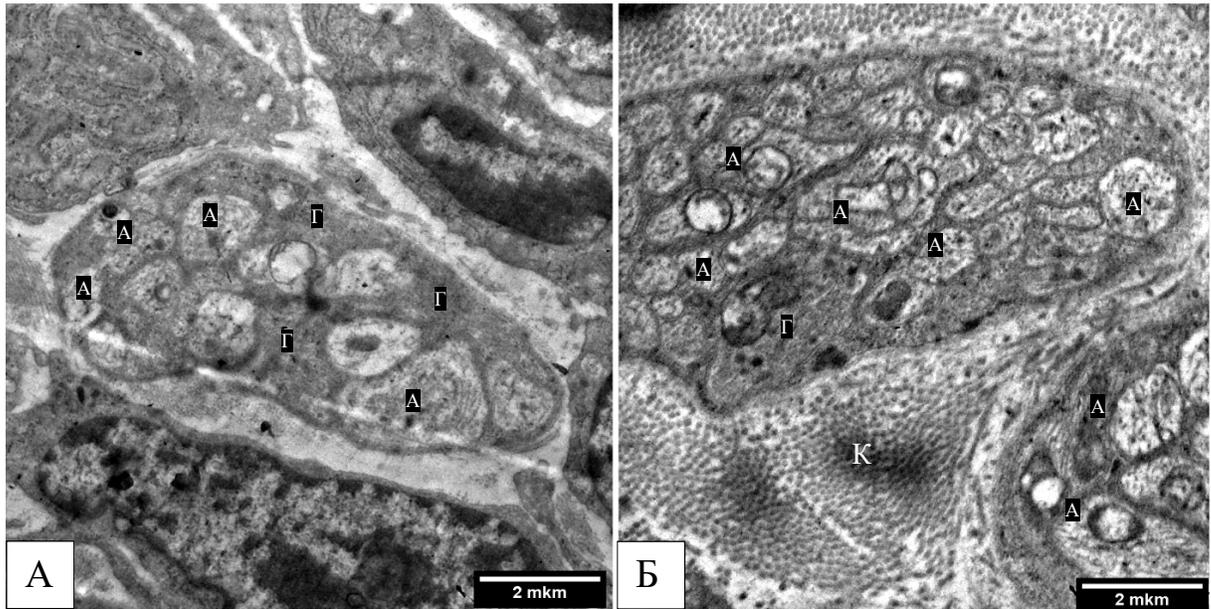


Рис. 33. Ультраструктурное строение субмукозного сплетения у мышей контрольной группы. А – в пространстве между криптами нервное волокно, состоящее из аксонов (А) и глиальных клеток (Г); Б – нервное волокно в подслизистой основе, окруженное многочисленными коллагеновыми фибриллами (К). Электронная микроскопия. Ув. 10 000

Таким образом, у мышей C57Bl/6 ЭНС в норме характеризовалась сложной трехмерной гистоархитектоникой и была представлена ганглиями и нервными волокнами как в мышечной, так и слизистой оболочке. Миентеральное и субмукозное нервные сплетения у мыши были образованы сетью ганглиев, соединяющими их нервными трактами и нервными волокнами разного диаметра. В миентеральном сплетении ганглии и нейроны в них располагались в одной плоскости. В миентеральных ганглиях преобладали нормо- и гипохромные нейроны, около 27% из них были нитрегергическими, а в цитоплазме большинства содержалось небольшое количество каспаза-3-положительных гранул. В миентеральных ганглиях проксимального отдела ободочной кишки глиальных клеток больше чем в дистальном. Субмукозные ганглии у мышей имели меньшие размеры чем миентеральные, а в дистальном отделе ободочной кишки они были единичные. Нервные волокна и S100b-позитивные клетки располагались между криптами в СПСО. При электронномикроскопическом исследовании энтеральные ганглии состояли из тел нейронов и глиальных клеток, и их отростки были окружены коллагеновыми фибриллами. В пределах ганглиев коллагеновые волокна отсутствовали, межклеточные пространства были небольшие. Нервные волокна по строению соответствовали нейропиллю энтеральных ганглиев.

3.2. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

Клинические проявления острого колита у самцов мышей C57Bl/6

На 3-5-ые сутки от начала потребления ДСН общее состояние животных опытной группы по сравнению с контрольной прогрессирующее ухудшалось, двигательная активность и потребление пищи снижались, отмечалась пилоэрекция и болевая поза (рис. 34 Б). На 7-ые сутки эксперимента у всех мышей с острым колитом выявлялось загрязнение анальной области фекалиями с примесью крови.

Функциональные изменения желудочно-кишечного тракта у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

С целью оценки нарушений моторной и абсорбционной функции ЖКТ определяли относительную массу сухого остатка кала и время транзита через ЖКТ красителей синего Эванса и кармина красного. Относительная масса сухого остатка фекалий у мышей с острым колитом уменьшилась: при колите она составила 22.62 (15.28;28.93) %, а в контрольной группе – 30.12 (30.47;37.62) %; $p=0.043$. Это указывает на нарушение абсорбционной функции кишечника. Время транзита красителей через ЖКТ между группами не различалось: при остром колите время транзита кармина красного составило 145 (135;155) мин, в контрольной группе – 135 (127;150) мин ($p=0.77$), а красителя синего Эванса при остром колите – 152 (132;153) мин и в контрольной группе – 139 (138;140) мин; $p=0.91$.

Макроскопическая характеристика ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

Ободочная кишка у мышей с острым колитом была розово-красной окраски, на всем протяжении ее содержимое было жидким, красно-бурого цвета (рис. 35 Б). Наблюдавшиеся в норме участки чередования сужения и расширения были сглажены. В слизистой оболочке выявлялись многочисленные очаги гиперемии и язвы. Язвенный процесс был максимально выражен в дистальном отделе ободочной кишки. Медиана длины кишки от слепой до терминального отдела ободочной у мышей с острым колитом составляла 3,3 (3.0;3.5) см, тогда как в контрольной группе – 5,5 (5.0;5.75) см; $p=0.009$ (рис. 36).

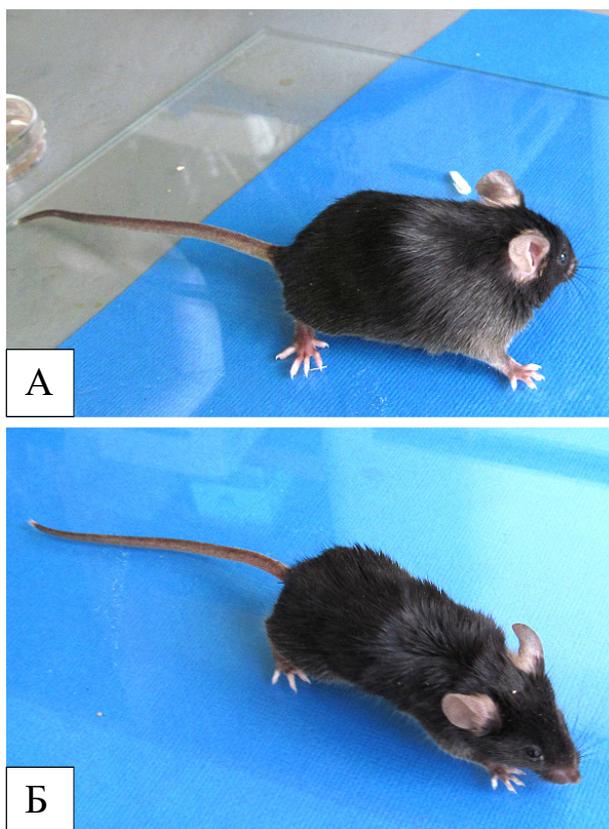


Рис. 34. Внешний вид мышей контрольной и опытной группы. А- контрольная группа - шерстный покров гладкий, блестящий; Б - острый колит, болевая поза, шерстный покров взъерошенный, тусклый



Рис. 35. Ободочная кишка у мышей контрольной группы и с острым колитом. А - контрольная группа. Толстая кишка блестящая, белесовато-розового цвета, имеет «гирляндиобразный» вид за счет участков сужения и расширения; Б - острый колит. Толстая кишка укорочена, белесовато-розового цвета, блестящая, с темно-красным содержимым, контуры сглаженные

Микроскопическая характеристика ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При морфологическом исследовании у мышей контрольной группы патологических изменений в стенке кишки не выявлено (рис. 37 А, Б). У мышей с острым колитом на протяжении длины ободочной кишки в слизистой оболочке были острые язвы, где крипты отсутствовали и выявлялась грануляционная ткань с выраженной воспалительной инфильтрацией макрофагами, лимфоцитами и нейтрофилами (рис. 37 В, Г). В подслизистой основе отмечался выраженный отек и инфильтрация лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами. В циркулярном и продольном слоях мышечной оболочки воспалительные изменения были минимальными (рис. 37, Г). Тяжесть процесса была наиболее выражена в дистальном отделе ободочной кишки. Средняя толщина мышечной оболочки в дистальном отделе ободочной кишки статистически значимо не различалась между группами и составила при остром колите 133 (102;134) мкм, тогда как в контрольной группе – 133 (129;134) мкм, $p=0.6$.

Таким образом, при остром ДСН-индуцированном колите в ободочной кишке выявлен воспалительно-язвенный процесс, более выраженный в ее дистальном отделе.

Морфологическая характеристика миентерального и субмукозного сплетений в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, миентеральное сплетение при остром колите, как и в контроле представлено образующими цепочку ганглиями, компактно расположенными между циркулярным и продольным слоями мышечной оболочки. Ганглии имели преимущественно округлую форму и состояли из нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток (рис. 38 А). По клеточному составу и строению нейропиля каких-либо отличий по сравнению с контрольной группой у мышей с острым колитом не обнаружено.

При окраске по методу Ниссля при остром колите в составе миентеральных ганглиев выявлялись нейроны, глиальные и неидентифицируемые клетки. На качественном уровне миентеральные ганглии при остром колите от контрольной группы не различались (рис. 39).

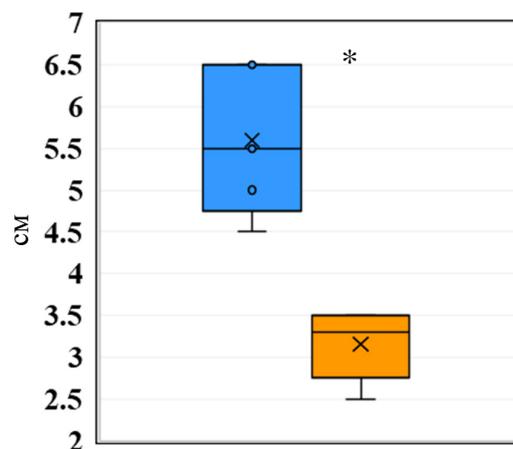


Рис. 36. Показатели длины ободочной кишки у мышей контрольной группы и с острым колитом. ■ - контрольная группа, ■ - острый колит, * - $p<0.05$

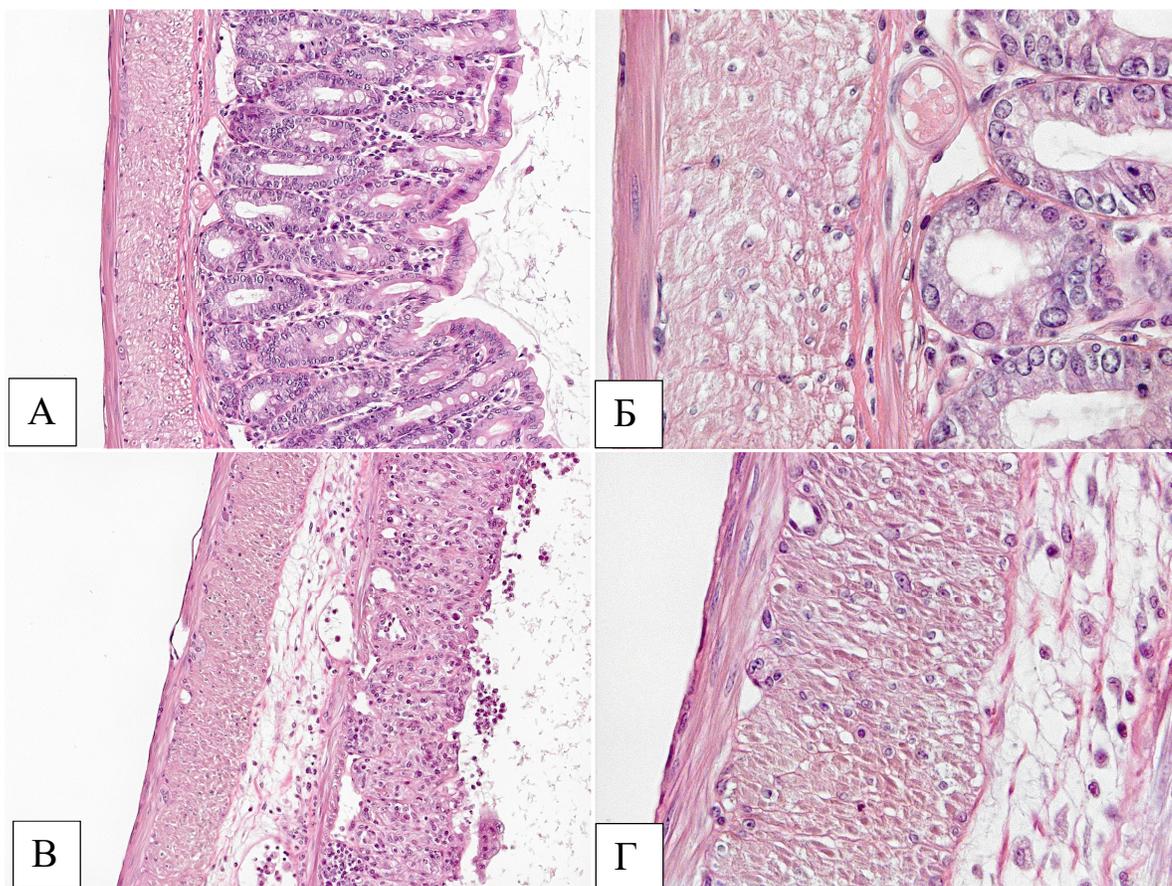


Рис. 37. Ободочная кишка у мыши контрольной группы (А, Б) и с острым колитом (В, Г). А, Б - эпителиальная выстилка сохранена, крипты с узкими просветами. Подслизистая основа представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, в СПСО небольшое количество клеточных элементов; В, Г - в СПСО язвы, образованные грануляционной тканью с выраженной воспалительной инфильтрацией. Крипты отсутствуют. Отмечается резко выраженный отек и воспалительная инфильтрация подслизистой основы. Воспалительные изменения в мышечной оболочке отсутствуют. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 200 (А, В), 400 (Б, Г)

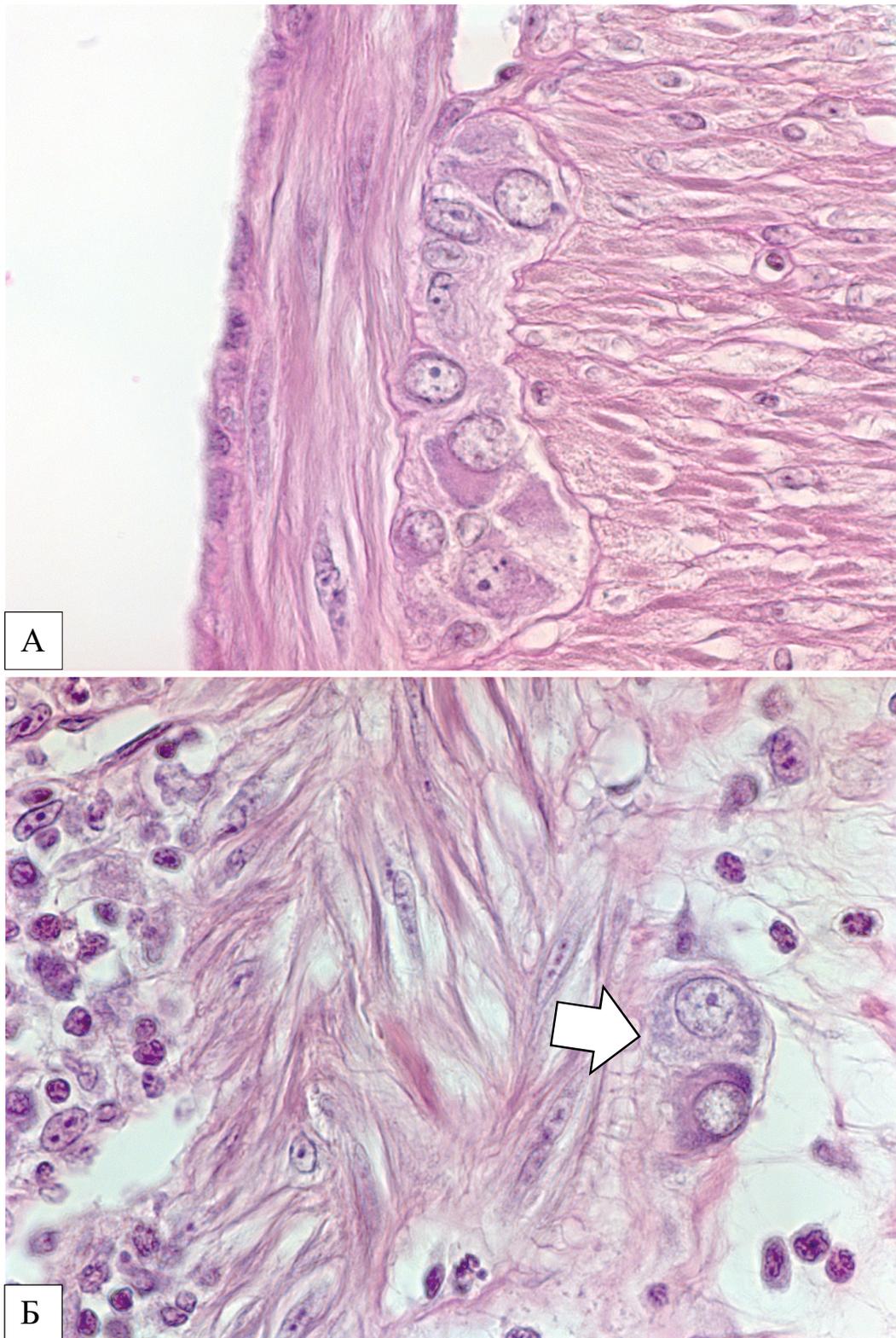


Рис. 38. Острый колит. Энтеральные ганглии ободочной кишки у мышей; А – миентеральный ганглий с несколькими нейронами и глиальными клетками; Б – субмукозный ганглий (стрелка) с двумя нейронами. В подслизистой основе отек и воспалительная инфильтрация. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 640

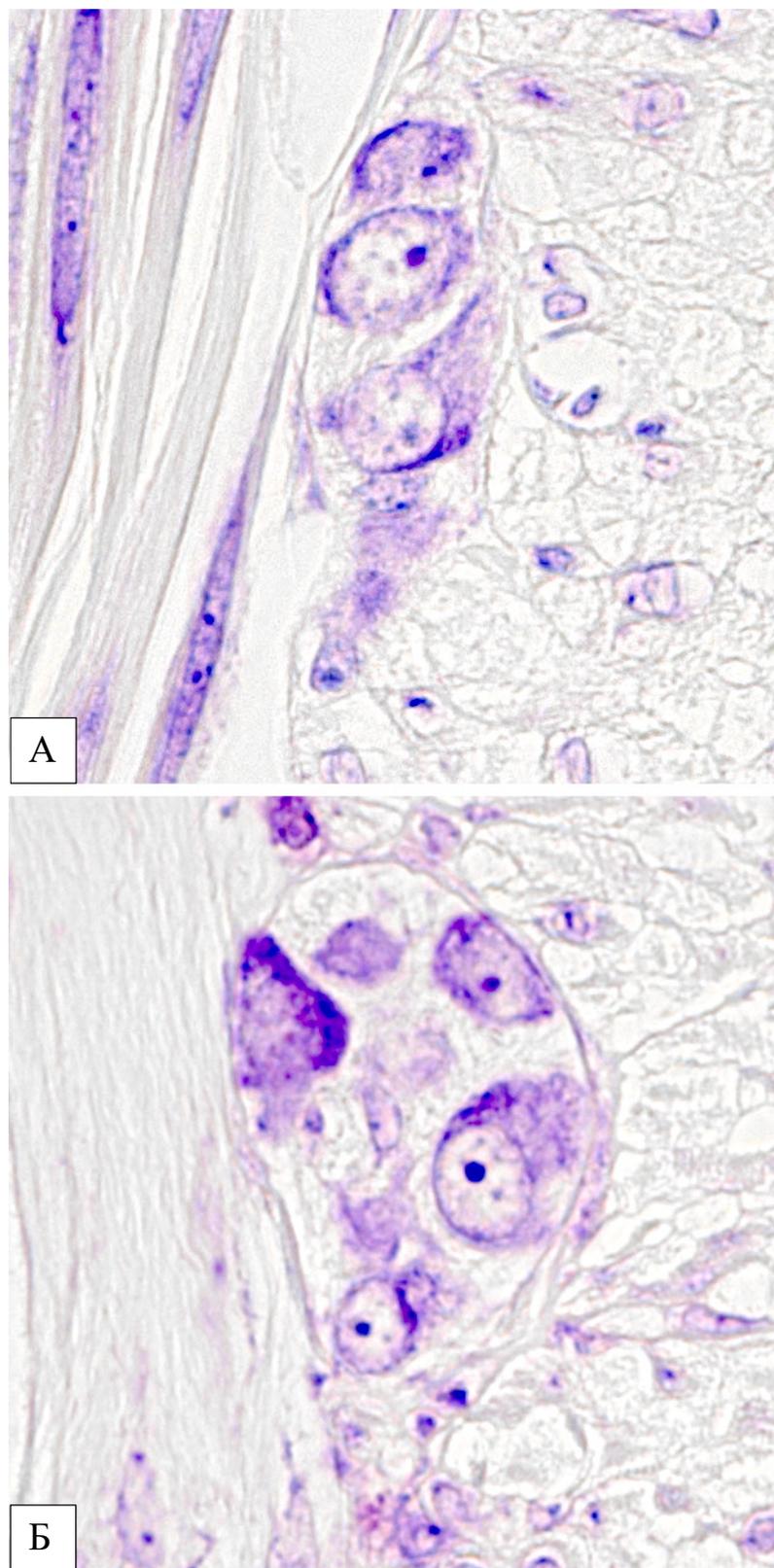


Рис. 39. Миентеральные ганглии ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и при остром колите (Б). На качественном уровне отличий нет. Окрашивание по методу Ниссля. Ув. 640

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, субмукозное сплетение было представлено ганглиями, компактно расположенными в соединительной ткани подслизистой основы (рис. 38 Б). Субмукозные ганглии имели округлую, реже овальную форму и состояли из 1-3 нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток. Подобно другим структурам подслизистой основы они были окружены многочисленными клетками воспалительного инфильтрата. По морфологической характеристике нейроны и глиальные клетки субмукозных ганглиев не отличались от миентеральных. При окрашивании по методу Ниссля подслизистые ганглии состояли из нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток и нейропиля.

При исследовании окрашенных пикросириусом красным гистологических препаратов в проходящем и поляризованном свете при перекрещенных поляризаторах вокруг миентеральных ганглиев визуализировалась тонкая соединительнотканная капсула (рис. 40 А, Б), в которой чередовались участки желто-зеленого и красно-оранжевого цвета (рис. 40 Б), что соответствует незрелому и зрелому коллагену. Капсула имела относительно равномерную толщину и переходила в соединительнотканную строму мышечной оболочки. Субмукозные ганглии были окружены соединительнотканной оболочкой красно-оранжевого цвета в поляризованном свете. По сравнению с контрольной группой при остром колите коллагеновые волокна были разрезаны и располагались неупорядоченно (рис. 40 А, Б).

Количественная характеристика энтеральных ганглиев и клеточный состав миентеральных ганглиев в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При остром колите на гистологических срезах, окрашенных по методу Ниссля, количество миентеральных ганглиев возросло во всех отделах ободочной кишки, а субмукозных увеличилось в проксимальном отделе (табл. 4). По данным количественной оценки клеточного состава миентеральных ганглиев при суммировании всех отделов ободочной кишки при остром колите по сравнению с контрольной группой отмечалось статистически значимое уменьшение числа гипохромных нейронов и глиальных клеток на ганглий (табл. 5). В медиальном отделе при остром колите также статистически значимо возрос нейрон-глиальный индекс (табл. 5). При цитометрическом исследовании отмечено уменьшение размеров нейронов в дистальном отделе (табл. 6).

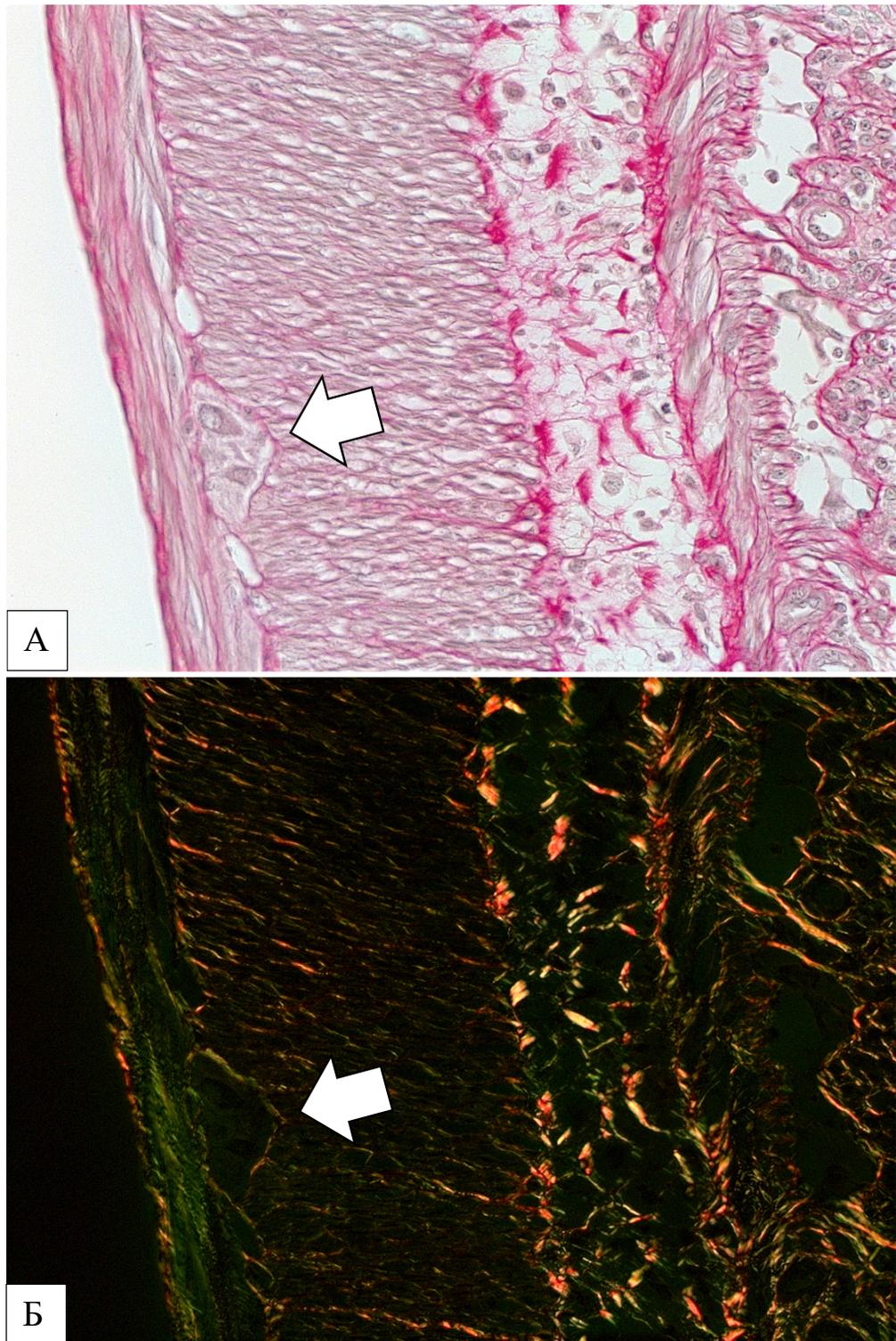


Рис. 40. Острый колит. Соединительнотканная капсула мышечной оболочки и подслизистой основы ободочной кишки у мыши: А – в неполяризованном свете визуализируется соединительная ткань вокруг ганглиев (стрелка), в мышечной оболочке и подслизистой основе. Ганглии окружены соединительнотканной капсулой. В подслизистой основе коллагеновые волокна расположены хаотично; Б - в поляризованном свете периганглионарная соединительная ткань (стрелка) имеет красно-желтый и зеленый цвет. Окрашивание пикросирусом красным. Ув. 400

Таблица 4

Количество энтеральных ганглиев на 1 мм длины ободочной кишки у мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым колитом, Ме (25L;75U)

Отделы, группы	Сумма отделов		р	Проксимальный		р	Медиальный		р	Дистальный		р
	Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит	
Минтеральные	3.50 (3.42;3.55)	13.51 (11.59;13.80)	0.01	3.75 (3.69;3.99)	15.10 (11.10;15.70)	0.01	3.85 (3.09;3.94)	12.68 (9.97;14.18)	0.01	3.78 (3.11;3.92)	11.39 (10.82;14.77)	0.01
Субмукозные	0.41 (0.34;0.43)	1.65 (1.08;1.83)	0.01	0.80 (0.74;0.86)	3.33 (2.88;3.47)	0.01	0.33 (0.21;0.44)	0.36 (0.35;1.06)	0.46	0	0.42 (0;0.43)	0.25

Таблица 5

Клеточный состав миентеральных ганглиев ободочной кишки у мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым колитом, Me (25L;75U)

Отделы, группы	Сумма отделов		p	Проксимальный отдел		p	Медиальный отдел		p	Дистальный отдел		p
	Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит	
Нормохромные нейроны	0.63 (0.54;0.64)	0.57 (0.56;0.62)	0.68	0.50 (0.50;0.58)	0.50 (0.48;0.55)	0.68	0.50 (0.48;0.55)	0.60 (0.55;0.60)	0.30	0.70 (0.68;0.88)	0.58 (0.53;0.75)	0.60
Гипохромные нейроны	0.48 (0.41;0.53)	0.29 (0.19;0.38)	0.047	0.40 (0.40;0.45)	0.30 (0.15;0.35)	0.06	0.38 (0.38;0.58)	0.25 (0.23;0.38)	0.21	0.43 (0.40;0.48)	0.25 (0.18;0.38)	0.17
Гиперхромные нейроны	0.08 (0.07;0.08)	0.15 (0.12;0.23)	0.09	0.10 (0.05;0.10)	0.18 (0.13;0.20)	0.09	0.10 (0.05;0.13)	0.08 (0.08;0.13)	0.83	0.08 (0.05;0.08)	0.13 (0.08;0.38)	0.17
Все нейроны центрального сечения	1.13 (1.07;1.22)	1.00 (0.93;1.08)	0.60	1.00 (0.93;1.08)	0.85 (0.80;1.00)	0.40	1.00 (0.98;1.05)	1.00 (0.85;1.13)	0.83	1.20 (1.15;1.35)	1.03 (1.00;1.13)	0.35
Нейроны без ядрышка	0.33 (0.21;0.38)	0.34 (0.34;0.39)	0.75	0.25 (0.20;0.50)	0.40 (0.38;0.43)	0.40	0.33 (0.28;0.35)	0.35 (0.33;0.40)	0.75	0.23 (0.13;0.48)	0.28 (0.28;0.40)	0.92
Пикнотические нейроны	0.08 (0.07;0.08)	0.08 (0.07;0.09)	0.75	0.05 (0.03;0.08)	0.08 (0.08;0.10)	0.46	0.05 (0.05;0.08)	0.10 (0.05;0.13)	0.29	0.10 (0.05;0.13)	0.08 (0.05;0.10)	0.75
Нормохромные нейроны без ядра	1.23 (1.21;1.30)	1.10 (1.09;1.11)	0.12	1.40 (1.10;1.88)	1.15 (1.03;1.25)	0.17	1.38 (0.75;1.45)	1.03 (0.93;1.23)	0.60	1.05 (0.85;1.05)	1.03 (0.98;1.08)	0.60
Глиальные клетки	1.81 (1.80;1.86)	1.45 (1.29;1.46)	0.01	1.98 (1.90;2.78)	1.80 (1.68;1.93)	0.25	1.93 (1.80;2.08)	1.33 (1.18;1.33)	0.01	1.48 (1.45;1.63)	1.13 (1.10;1.30)	0.03
Нейрон-глиальное отношение	0.60 (0.50;0.71)	0.74 (0.74;0.75)	0.03	0.49 (0.39;0.52)	0.60 (0.44;0.68)	0.35	0.54 (0.48;0.57)	0.85 (0.77;0.85)	0.03	0.71 (0.58;1.13)	0.87 (0.71;0.93)	0.46

Таблица 6

Цитометрические показатели нейронов миентеральных ганглиев в разных отделах ободочной кишки у мышей C57Bl/6 в контрольной группе и при остром колите, Me (25L;75U)

Показатели	Сумма отделов		p	Проксимальный отдел		p	Медиальный отдел		p	Дистальный отдел		p
	Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит		Контрольная группа	Острый колит	
Площадь сечения сомы нейронов, мкм ²	97.2 (94.6;108.5)	88.5 (88.0;89.4)	0.12	99.2 (95.9;117.8)	86.2 (77.1;88.2)	0.12	102.5 (90.2;102.7)	97.8 (80.7;107.2)	0.92	102.1 (93.6;104.8)	89.4 (79.5;104.2)	0.03
Площадь сечения ядра нейронов мкм ²	46.1 (45.1;47.7)	42.9 (41.9;45.5)	0.08	49.0 (39.9;53.4)	44.3 (40.9;44.6)	0.60	49.0 (43.3;50.0)	44.8 (39.6;46.1)	0.46	44.8 (43.5;49.5)	40.4 (36.6;47.5)	0.46
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0.50 (0.47;0.50)	0.50 (0.49;0.52)	0.25	0.47 (0.46;0.50)	0.54 (0.51;0.56)	0.17	0.51 (0.50;0.51)	0.49 (0.47;0.50)	0.60	0.47 (0.45;0.48)	0.49 (0.48;0.51)	0.35

Таким образом, на качественном уровне при остром колите миентеральные и субмукозные ганглии не отличались от таковой контрольной группы. Однако, по данным морфометрической оценки при остром колите отмечено увеличение числа миентеральных ганглиев во всех отделах ободочной кишки, а субмукозных в проксимальном отделе. По сравнению с контрольной группой при остром колите выявлено снижение числа гипохромных нейронов и глиальных клеток в миентеральных ганглиях, а также уменьшение размеров миентеральных нейронов в дистальном отделе ободочной кишки.

Морфологическая характеристика маркированного антителами к β III-тубулину и S100b миентерального сплетения дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

Поскольку при морфологическом исследовании язвенно-воспалительный процесс при ДСН-индуцированном колите был наиболее выражен в дистальном отделе, ИГХ и ИФ исследования выполнены на материале этого отдела.

Проводили ИГХ исследование продольных срезов дистального отдела ободочной кишки с использованием антител к β III-тубулину и S100b. При остром колите на качественном уровне отмечено увеличение плотности нервных волокон в циркулярном слое мышечной оболочки (рис. 41 Б, 42 А). По сравнению с контрольной группой при остром колите миентеральные ганглии были преимущественно сферической формы. На границе мышечной оболочки и подслизистой основы располагались многочисленные нервные волокна, идущие параллельно циркулярному слою мышечной оболочки.

В составе миентеральных ганглиев нейропиль был S100b-положительным. В циркулярном слое мышечной оболочки по ходу нервных волокон определялись S100b-позитивные глиальные клетки в виде поперечных и тангенциальных профилей (рис. 43 А). На качественном уровне в обеих группах отмечена вариабельность количества и интенсивности окрашивания S100b-положительных структур (рис. 44).

По данным количественной оценки у животных с острым колитом были увеличены показатели относительной площади β III-тубулин-положительных структур в циркулярном слое мышечной оболочки, а также количество нервных волокон на стандартной площади в 1000 мкм² (табл. 7, рис. 45). Показатели относительной площади S100b-положительных структур и их количество в мышечной оболочке не различались у животных контрольной группы и с острым колитом, а их минимальный диаметр Фере снизился при остром колите (табл. 8).

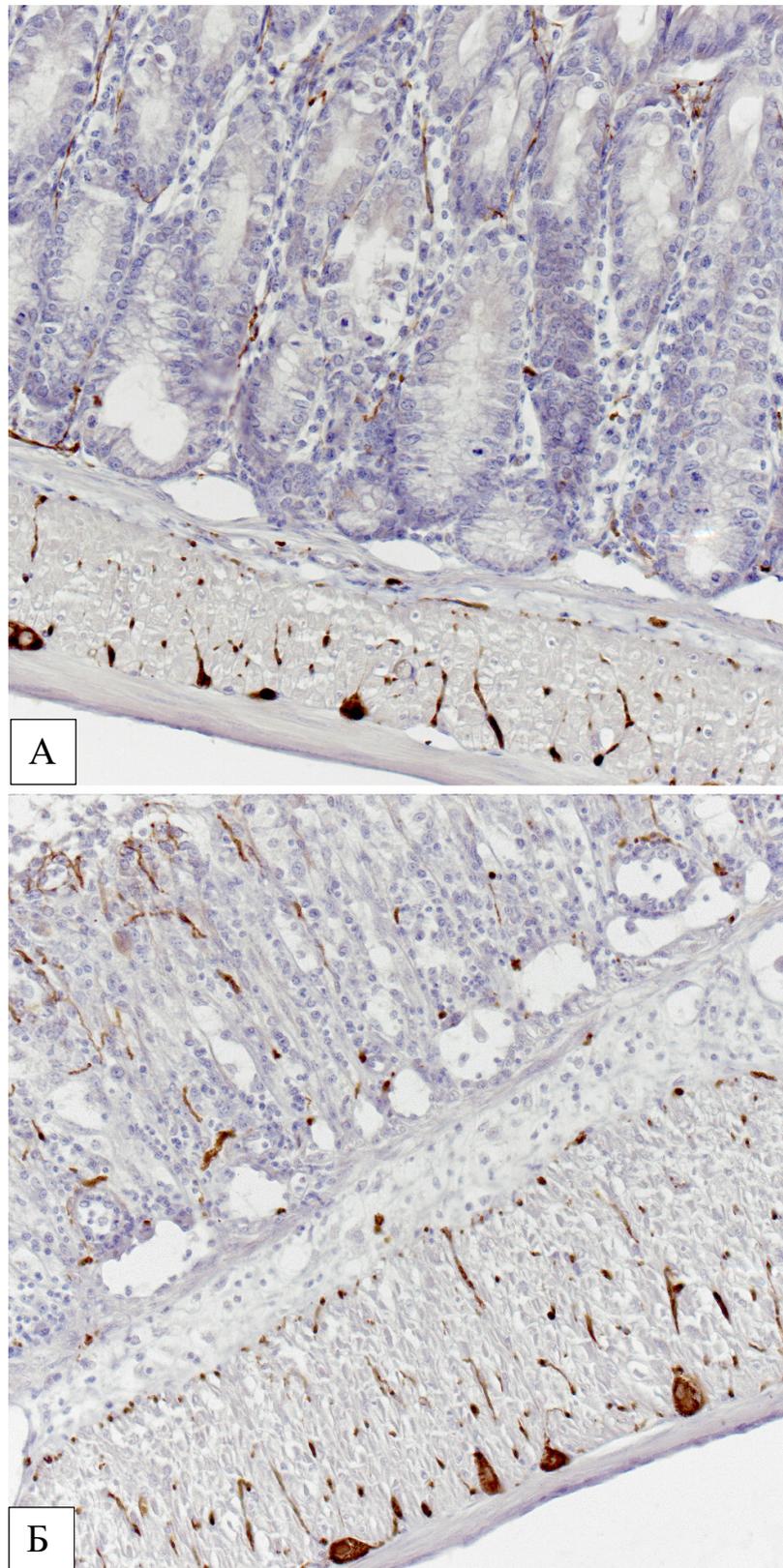


Рис. 41. Нервные волокна в мышечной оболочке и СПСО дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и при остром колите (Б). ИГХ окрашивание антителами к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 200

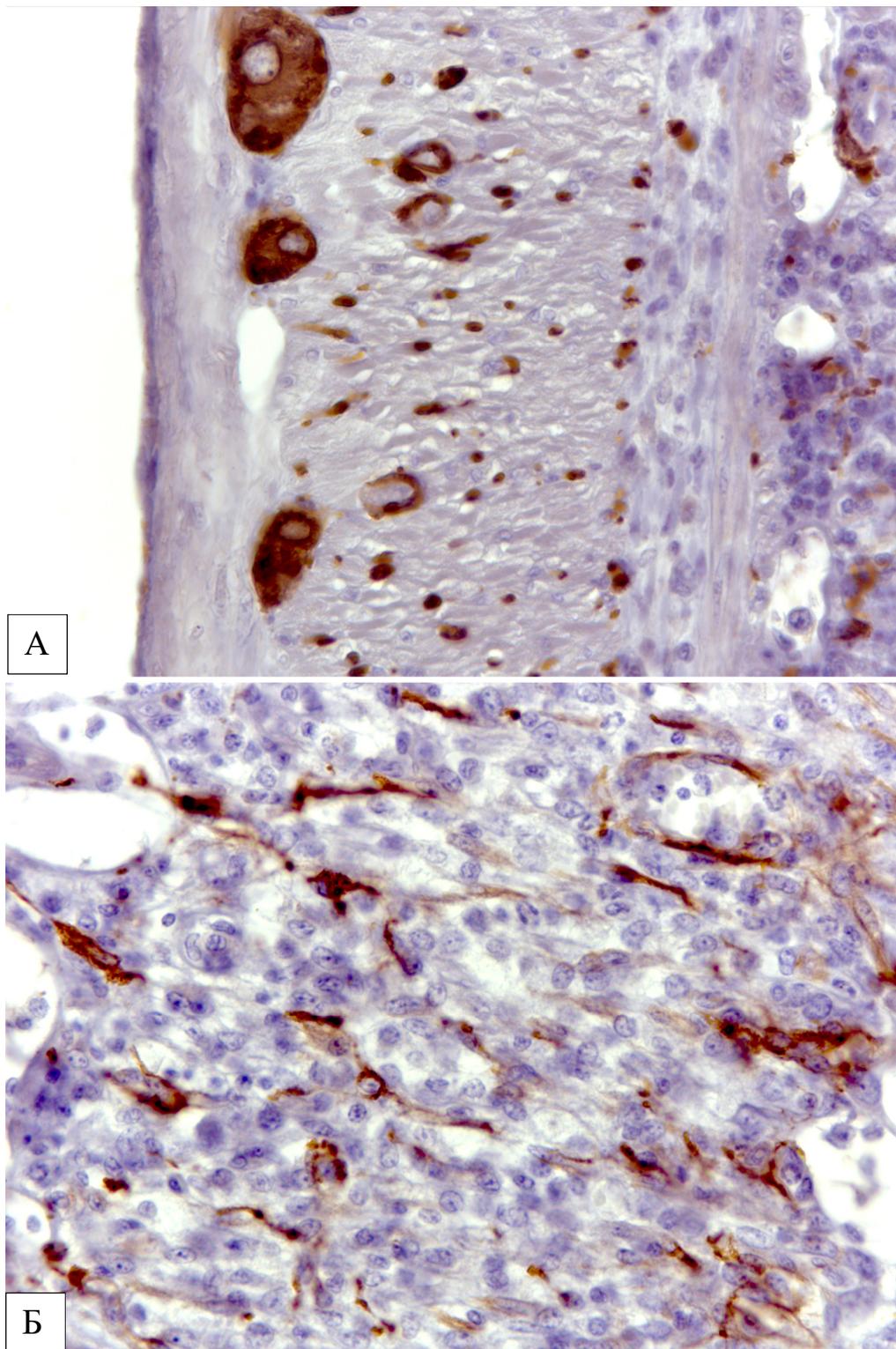


Рис. 42. Нервные волокна в мышечной оболочке и СПСО дистального отдела ободочной кишки у мыши при остром колите. А – нервные волокна в мышечной оболочке; Б – нервные волокна пронизывают грануляционную ткань, их количество больше в поверхностных отделах язвы. ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

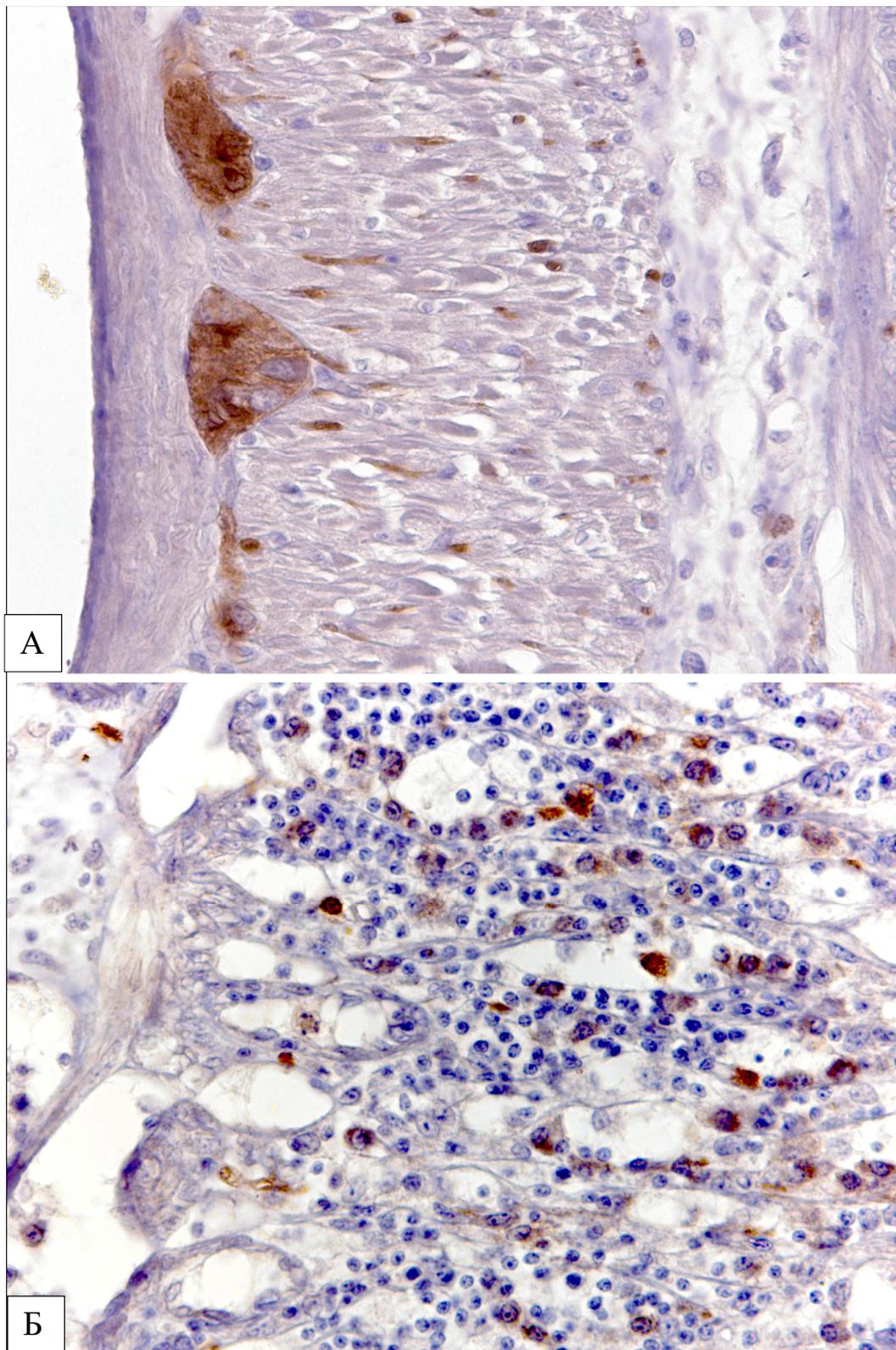


Рис. 43. Острый колит. Глиальные клетки и их отростки в мышечной оболочке (А) и грануляционной ткани (Б) ободочной кишки. В СПСО выявляются многочисленные S100b-положительные клетки. ИГХ окрашивание с использованием антител к S100b. Окрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

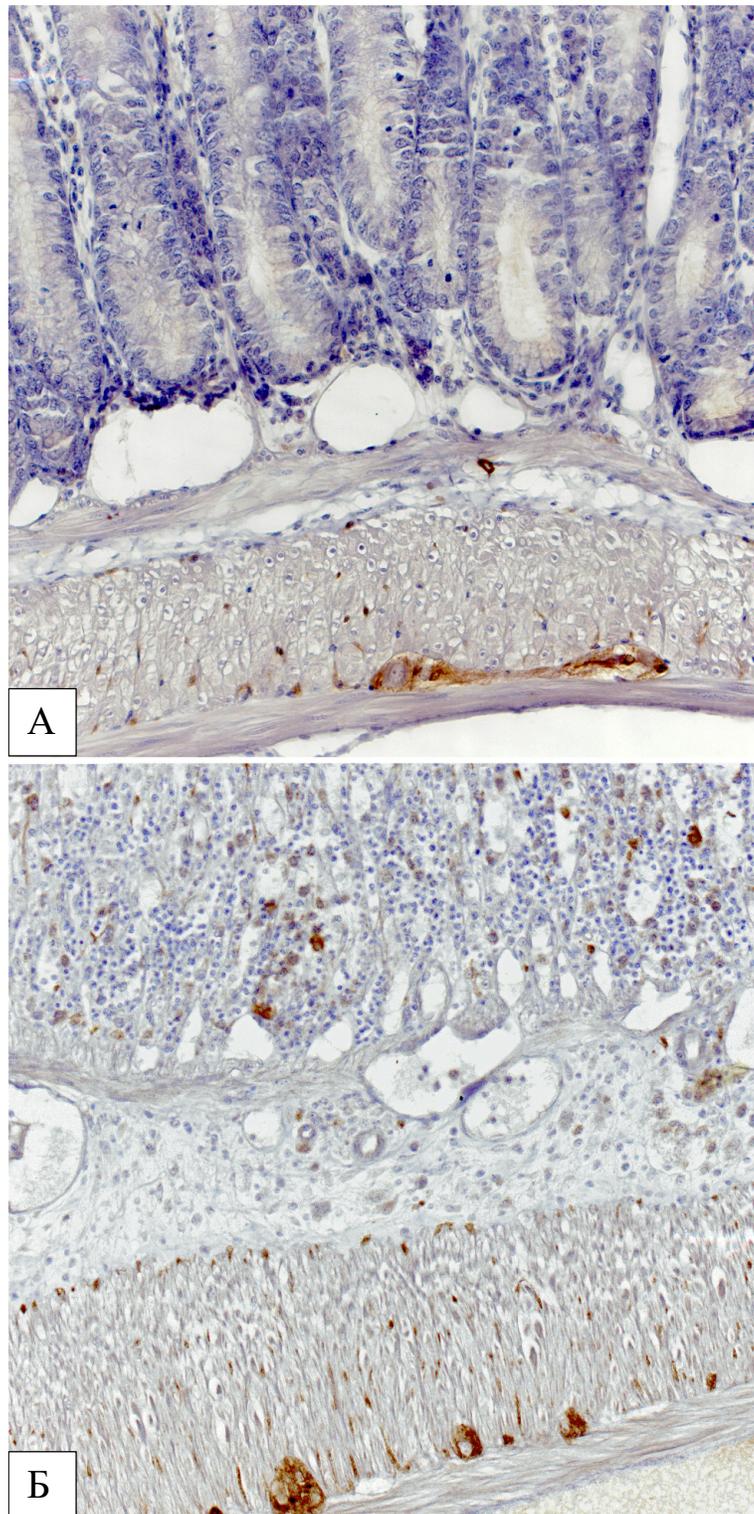


Рис. 44. Глиальные клетки и их отростки в мышечной оболочке и СПСО дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы и при остром колите. При остром колите (Б) как и в контроле (А) в мышечной оболочке выявляются глиальные клетки по ходу нервных волокон. В СПСО количество S100b-позитивных клеток увеличено. ИГХ окрашивание антителами к S100b. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 200

Таблица 7

Количественная характеристика маркированных βIII-тубулином нервных волокон в дистальном отделе ободочной кишки у мышей C57Bl/6 в контрольной группе и при остром колите, Me (25L;75U)

Оболочки	Параметры	Контрольная группа	Острый колит	p
Циркулярный слой мышечной оболочки	Относительная площадь, %	3.63 (2.61;3.67)	4.39 (4.38;5.43)	0.047
	Количество на 1000 мкм ²	2.67 (2.55;2.69)	3.40 (3.11;3.87)	0.01
	Минимальный диаметр Фере, мкм	2.70 (2.55;2.84)	2.69 (2.64;2.79)	0.91
СПСО и грануляционная ткань в СПСО	Относительная площадь, %	1.23 (1.09;1.24)	4.75 (3.58;4.81)	0.01
	Количество на 1000 мкм ²	0.90 (0.86;1.06)	2.60 (2.58;2.72)	0.01
	Минимальный диаметр Фере, мкм	2.59 (2.54;2.82)	3.05 (3.02;3.23)	0.03

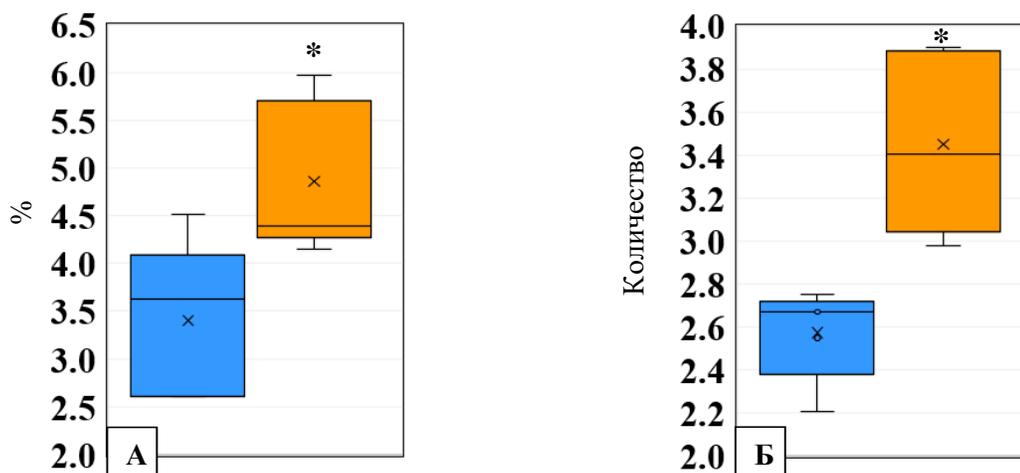


Рис. 45. Относительная площадь (А) нервных волокон и их количество на 1000 мкм² (Б) в циркулярном слое мышечной оболочки ободочной кишки у мышей контрольной группы и при остром колите,

■ - контрольная группа, ■ - острый колит, * - p<0.05

Таблица 8

Количественная характеристика маркированных S100b-положительных структур в дистальном отделе ободочной кишки у мышей C57Bl/6 контрольной группы и при остром колите, Me (25L;75U)

Оболочки	Параметры	Контрольная группа	Острый колит	p
Циркулярный слой мышечной оболочки	Относительная площадь, %	1.28 (0.89;2.23)	1.09 (0.88;2.15)	0.60
	Количество на 1000 мкм ²	1.21 (0.88;1.69)	1.29 (1.19;2.36)	0.34
	Минимальный диаметр Фере, мкм	2.52 (2.45;2.68)	2.15 (2.15;2.28)	0.03
СПСО и грануляционная ткань в СПСО	Количество клеток на 1000 мкм ²	0.12 (0.02;0.19)	0.60 (0.23;0.62)	0.01

Морфологическая характеристика маркированного антителами к β III-тубулином и S100b субмукозного сплетения дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

Количество β III-тубулин-положительных волокон в СПСО при остром колите было увеличено, они были извитыми, деформированными, хаотично расположенными и пронизывали грануляционную ткань (рис. 41 Б, 42 Б, 46, 47). При количественной оценке β III-тубулин-положительных волокон в грануляционной ткани их относительная площадь, количество и минимальный диаметр Фере при остром колите возросли по сравнению с показателями СПСО у мышей контрольной группы (табл. 7, рис. 48).

При остром колите в СПСО выявлялись многочисленные S100b-положительные клетки, располагающиеся в воспалительном инфильтрате (рис. 43 Б, 44 Б). Их количество в грануляционной ткани в СПСО по сравнению с животными контрольной группы увеличилось (табл. 8, рис. 49).

Таким образом, при ИГХ исследовании у животных с острым колитом по сравнению с контрольной группой отмечено снижение количества и относительной площади β III-тубулин-положительных волокон в мышечной оболочке, а минимальный диаметр Фере S100b-положительных структур в мышечной оболочке уменьшился. При остром колите в СПСО и зонах язв количество и площадь нервных волокон также возросли, нервные волокна располагались хаотично, их было больше в поверхностных отделах язв. В тоже время показатели количества и относительной площади S100b-положительных структур в мышечной оболочке не различались между группами. В СПСО количество S100b-позитивных клеток при остром колите увеличилось.

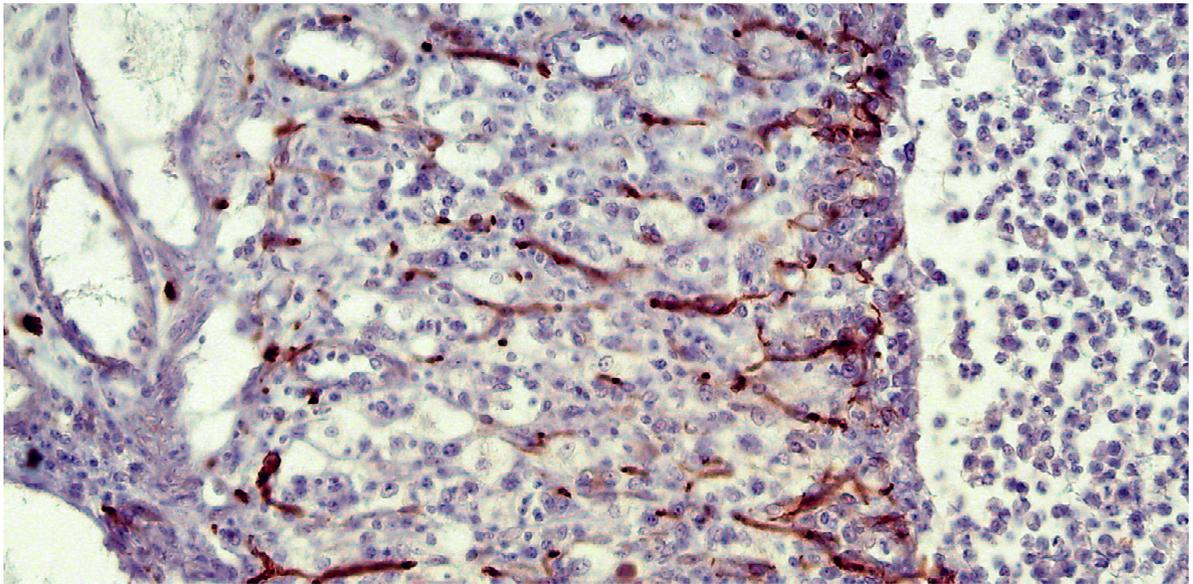


Рис. 46. Острый колит. Нервные волокна, локализованные в грануляционной ткани ободочной кишки. Количество нервных волокон в СПСО увеличено, они пронизывают грануляционную ткань. В поверхностных отделах язвы (правая часть рисунка) волокна образуют более плотную сеть чем в глубоких. ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 400

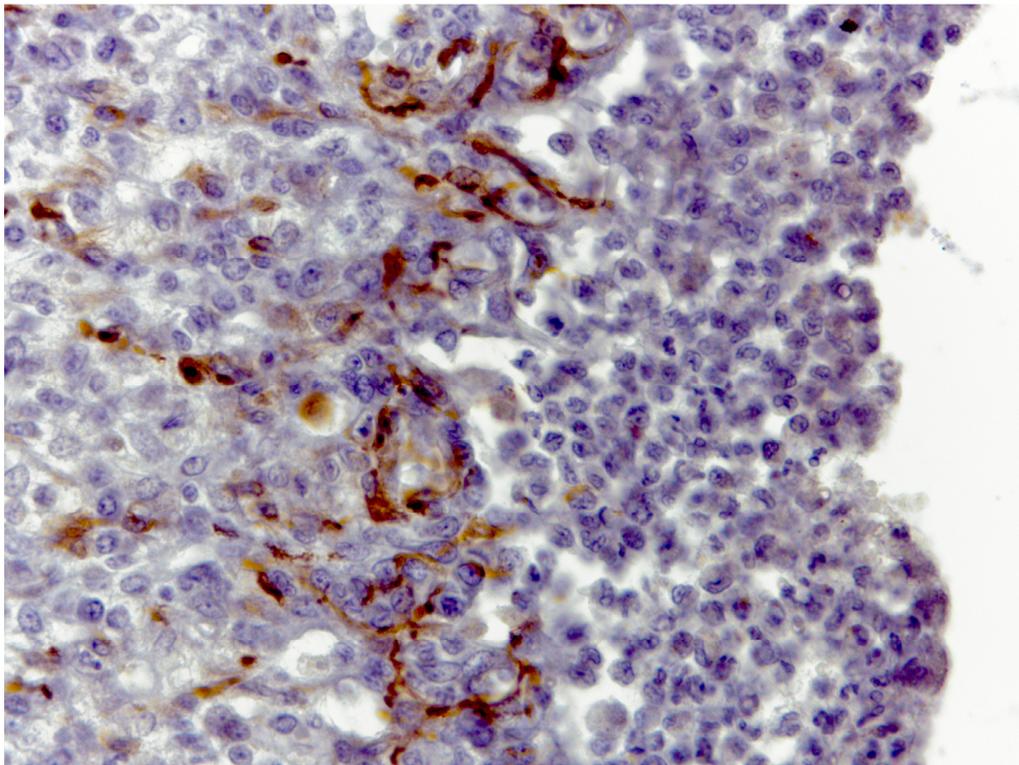


Рис. 47. Острый колит. Нервные волокна в поверхностных отделах язвы. На ее поверхности массивное скопление лейкоцитов. Нервные волокна извитые, деформированные, расположены хаотично. ИГХ окрашивание антителами к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

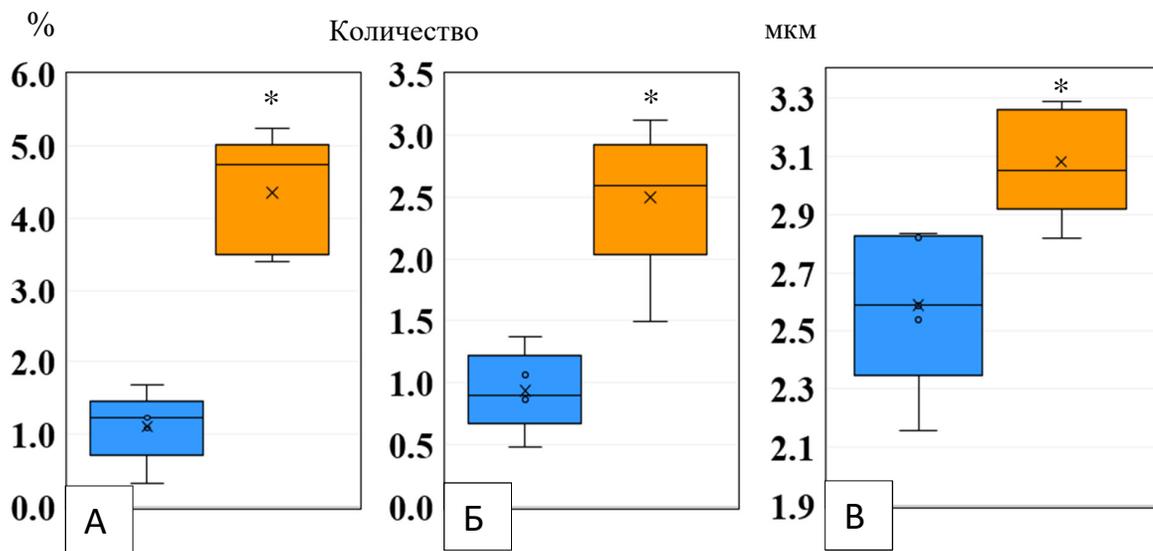


Рис. 48. Относительная площадь (А), количество на 1000 мкм² (Б) и средний диаметр (В) нервных волокон в СПСО дистального отдела ободочной кишки у мышей контрольной группы и при остром колите, ■ - контрольная группа, ■ - острый колит, * - p<0.05

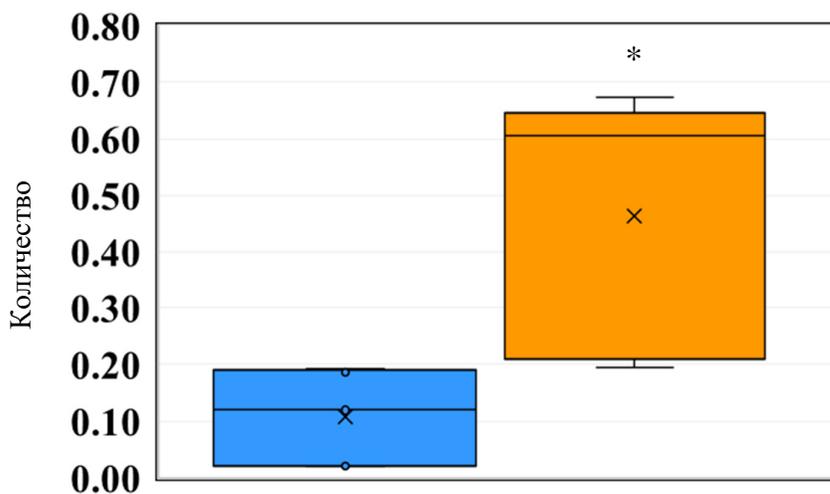


Рис. 49. Количество S100b-положительных клеток на 1000 мкм² СПСО дистального отдела ободочной кишки у мышей контрольной группы и при остром колите. ■ - контрольная группа, ■ - острый колит, * - p<0.05

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к HuC/D и S100b миентерального и субмукозного сплетений на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При ИФ исследовании с использованием антител к S100b и HuC/D у мышей с острым колитом в миентеральных ганглиях выявлялись тела нейронов, а также глиальные клетки и их отростки (рис. 50 А). В мышечной оболочке располагались тела и отростки внутримышечных глиальных клеток. По сравнению с контрольной группой отмечено увеличение количества миентеральных ганглиев в поле зрения, и они были более округлыми. На качественном уровне различий клеточного состава миентеральных ганглиев у мышей опытной и контрольной группы не выявлено.

При морфометрической оценке показатели количества глиальных клеток в миентеральных ганглиях статистически значимо не различались между группами (табл. 9).

Субмукозные ганглии, маркированные HuC/D и S100b, были окружены клетками воспалительного инфильтрата (рис. 50 Б), но на качественном уровне не отличались от ганглиев у мышей контрольной группы.

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к HuC/D и nNOS миентерального и субмукозного сплетений на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При ИФ исследовании с использованием антител к nNOS и HuC/D при остром колите, как и в контроле, в миентеральных ганглиях располагались нейроны, в которых выявлялись оба маркера (рис. 51 А, 52). В мышечной оболочке визуализировались nNOS-положительные нервные волокна. На качественном уровне различий в размерах нитрергических нейронов или распределении в них nNOS не обнаружено. В миентеральных ганглиях отмечалось статистически значимое снижение доли нитрергических нейронов (табл. 9).

В субмукозных ганглиях встречались единичные нитрергические нейроны, интенсивность свечения нейропиля была слабо выраженной (рис. 51 Б).

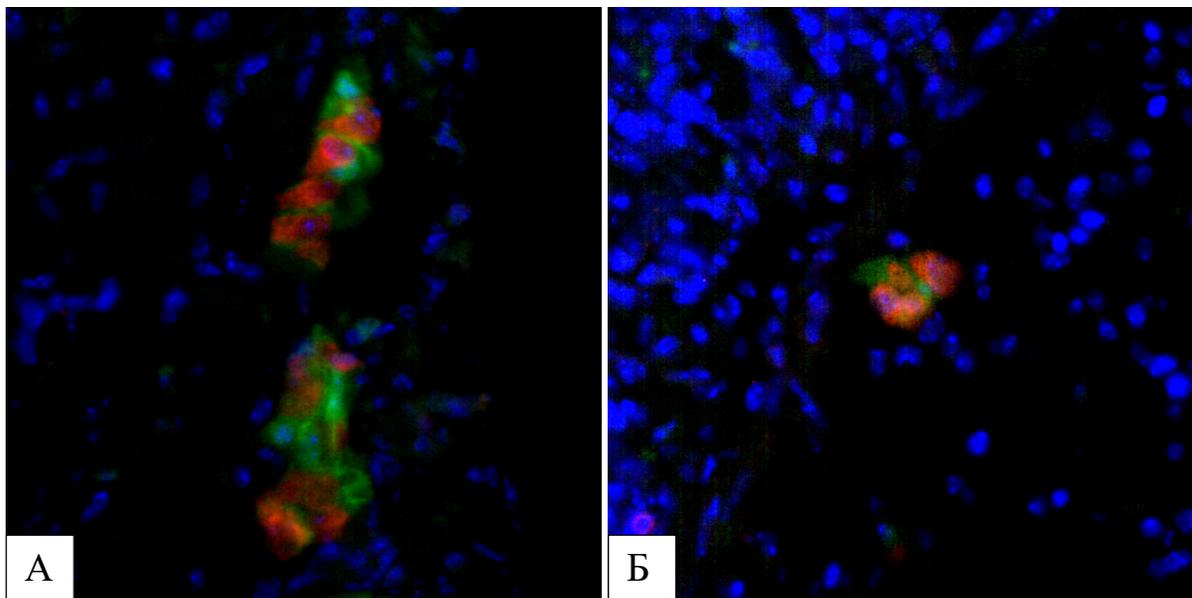


Рис. 50. Острый колит. Миентеральные (А) и субмукозный (Б) ганглии дистального отдела ободочной кишки мышей, маркированные антителами к HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), S100b и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

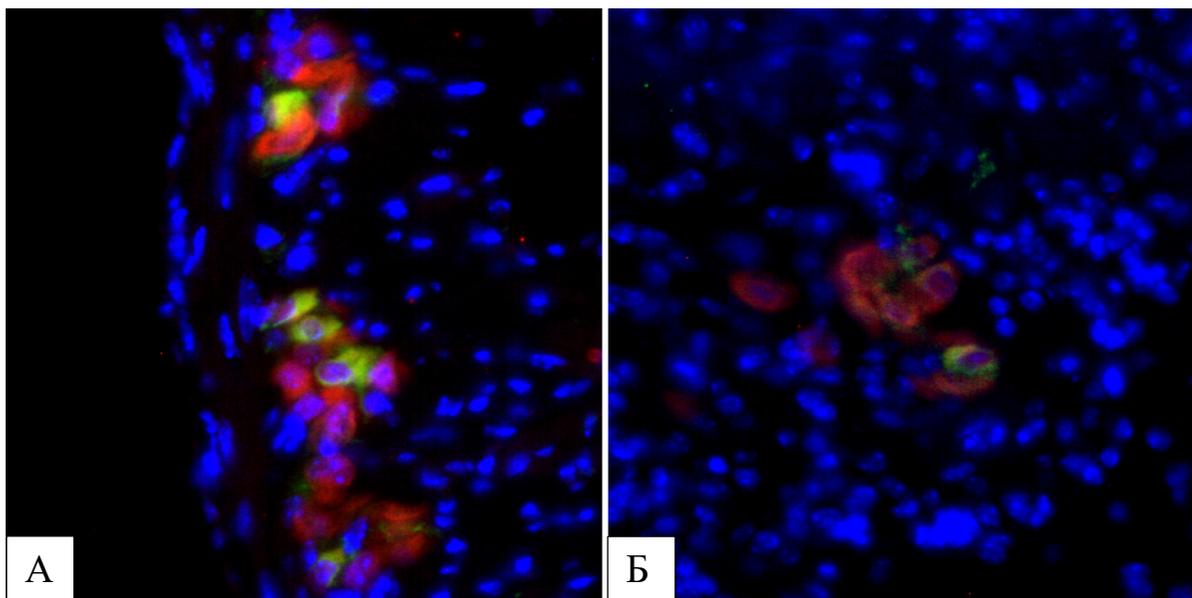


Рис. 51. Острый колит. Миентеральные(А) и субмукозный (Б) ганглии дистального отдела ободочной кишки мышей, маркированные антителами к HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), pNOS и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение) Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

Таблица 9

Количественные показатели клеток миентеральных ганглиев дистального отдела ободочной кишки у мышей C57Bl/6 в контрольной группе и при остром колите при маркировании антителами к паннейрональному маркеру - HuC/D, глиальному маркеру - S100b, нитрегических нейронов - nNOS и апоптоза - каспазы-3, Me (25L;75U)

Клетки		Контрольная группа	Острый колит	p
Нитрегические нейроны, %		27.55 (23.89;27.91)	20.16 (19.64;20.85)	0.01
Нейроны с различным количеством гранул каспазы-3 в цитоплазме, %	Небольшое количество	85.71 (84.09;87.50)	64.29 (61.90;66.67)	0.02
	Умеренное количество	12.50 (11.36;14.29)	24.49 (24.14;28.85)	0.03
	Большое количество	0*	17.46 (14.29;18.39)	0.01
	Нейроны, тотально заполненные гранулами	0*	5*	
Число глиальных клеток на миентеральный ганглий		1.28 (1.26;1.80)	1.17 (0.63;1.31)	0.35

Условное обозначение: * - число при малом количестве клеток

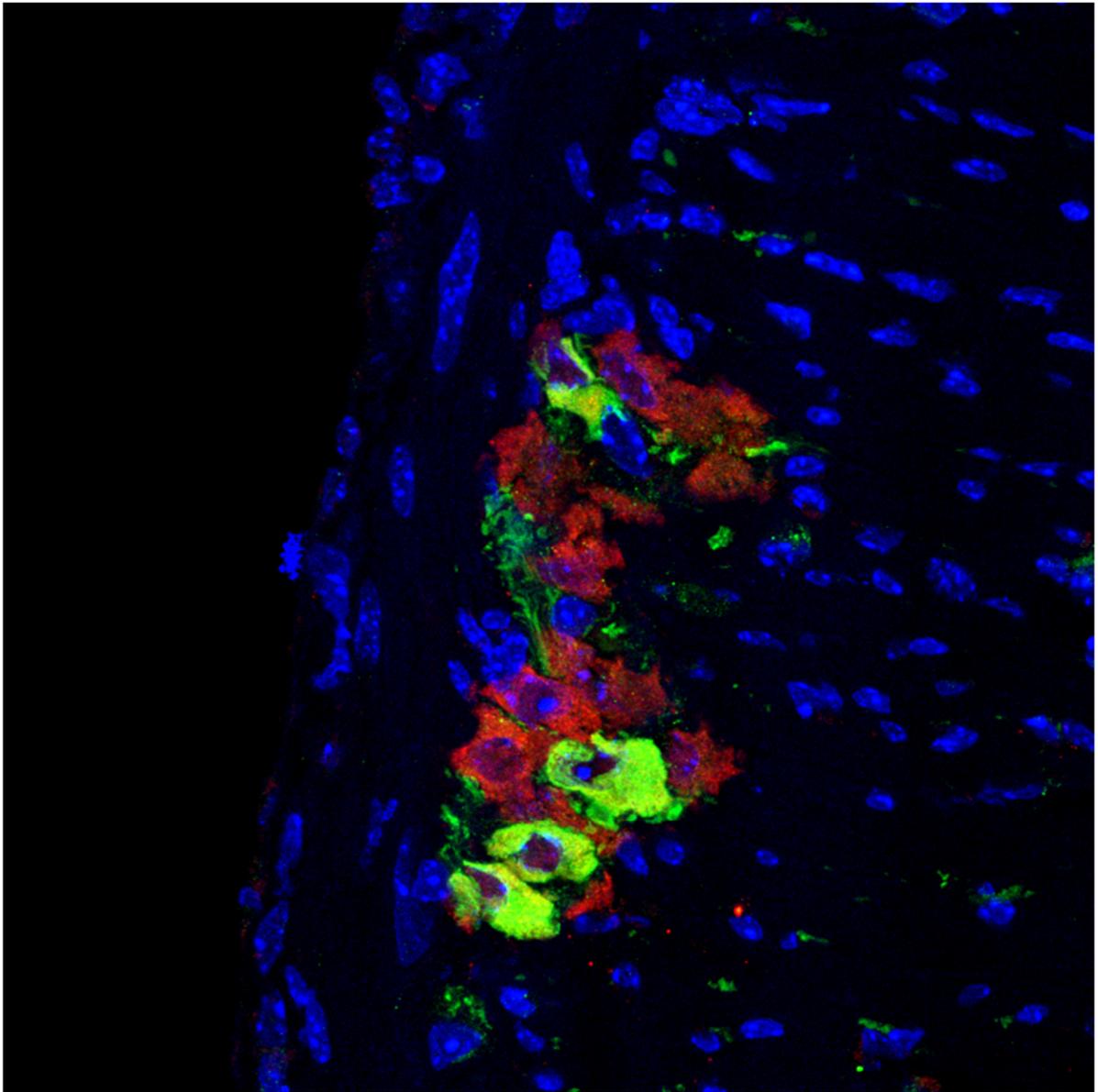


Рис. 52. Острый колит. Миентеральный ганглий дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированный антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), нитергических нейронов pNOS и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В миентеральном ганглии располагаются несколько нитергических нейронов. В нейропиле и окружающей мышечной оболочке выявляются pNOS-положительные нервные волокна. Гистологические срезы, конфокальная микроскопия. Ув. 640

Иммунофлуоресцентное исследование миентерального и субмукозного сплетения, маркированных антителами к HuC/D и каспазе-3, на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При ИФ исследовании с использованием антител к каспазе-3 и HuC/D при остром колите в цитоплазме практически всех нейронов миентерального и субмукозного сплетения выявлялись рассеянные, интенсивно светящиеся гранулы (рис. 53). Нейроны отличались различной интенсивностью зеленого свечения, от умеренной до выраженной, но при остром колите по сравнению с контрольной группой количество нейронов с высокой интенсивностью флюоресценции было значительно увеличено (рис. 54 Б). В небольшой части нейронов каспаза-3-позитивные гранулы заполняли всю цитоплазму. По данным количественной оценки число нейронов с большим количеством гранул возросло (табл. 9).

Иммунофлуоресцентное исследование миентерального и субмукозного сплетения, маркированных антителами к HuC/D и Ki67, на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При ИФ исследовании гистологических продольных срезов с использованием маркера клеточной пролиферации Ki67 при остром колите, как и в контрольной группе в ганглиях пролиферирующие клетки не выявлены.

Таким образом, при ИФ исследовании продольных срезов дистального отдела ободочной кишки у мышей с острым колитом отмечено уменьшение относительного количества нитрергических нейронов в миентеральных ганглиях. При остром колите в нейронах миентеральных ганглиев обнаружено увеличение количества каспаза-3-положительных гранул. В отдельных нейронах каспаза-3-положительные гранулы тотально заполняли всю цитоплазму.

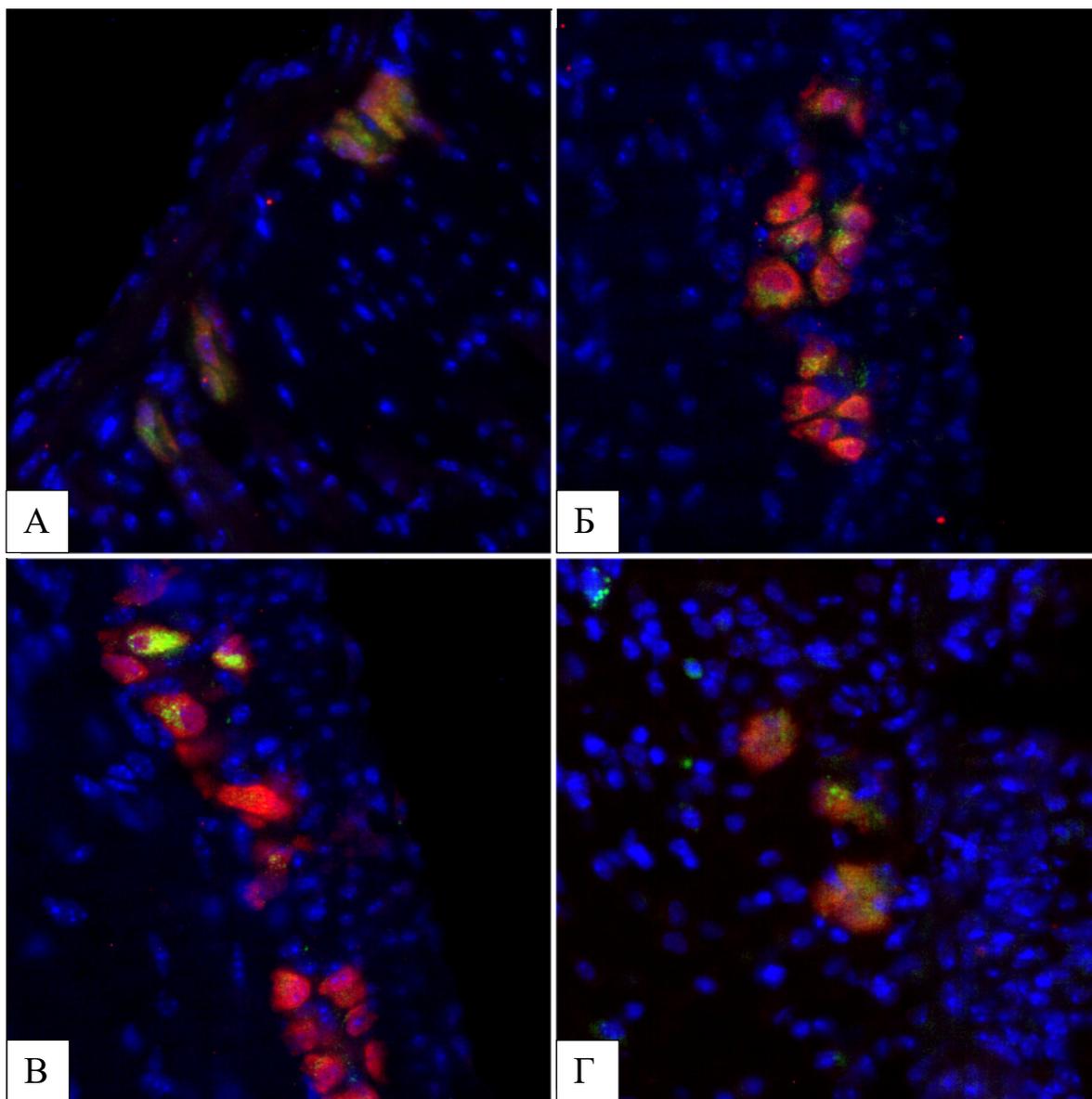


Рис. 53. Острый колит. Миентеральные (А, Б, В) и субмукозный (Г) ганглии дистального отдела ободочной кишки мышей, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к каспазе-3 и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В части нейронов большое количество гранул каспазы-3. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

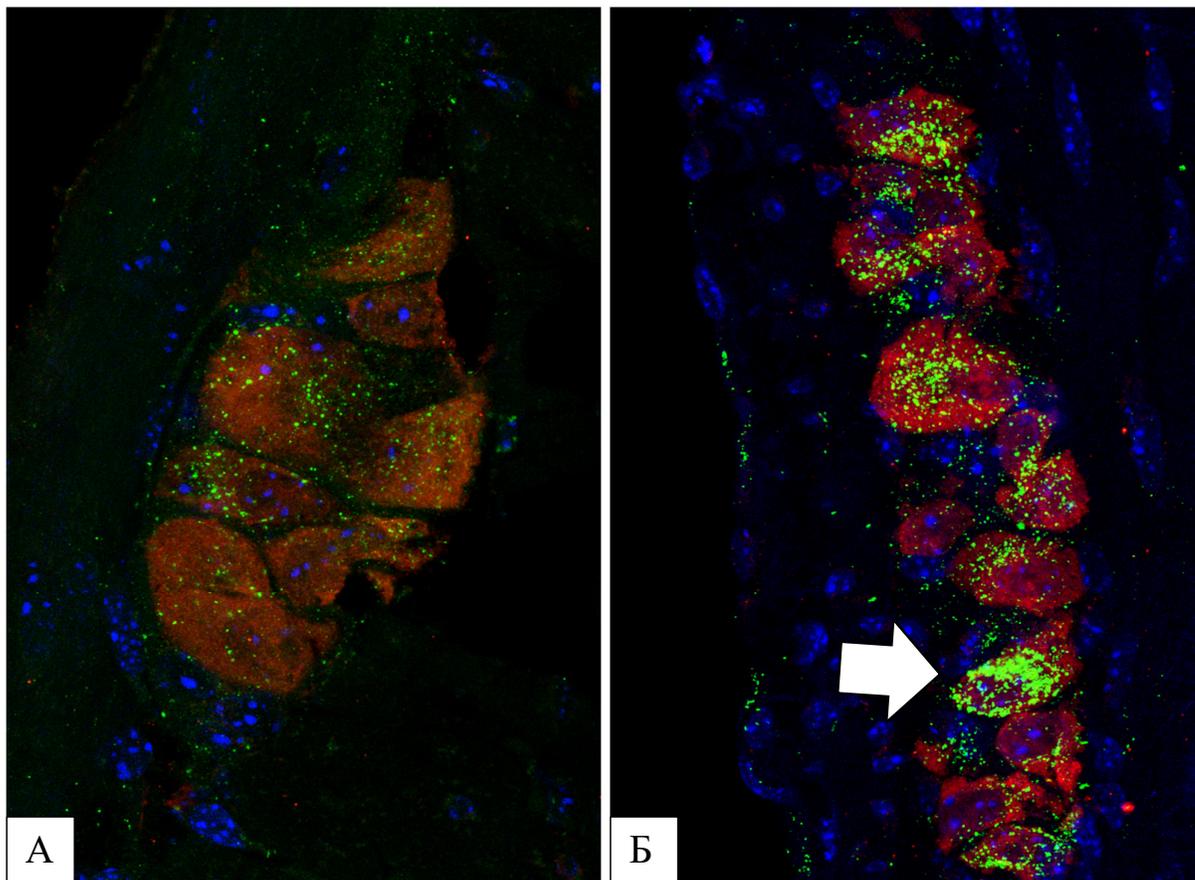


Рис. 54. Миентеральные ганглии дистального отдела ободочной кишки, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к каспазе-3 и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение), у мыши контрольной группы (А) и при остром колите (Б). В цитоплазме нейронов гранулы, иммунореактивные по каспазе-3, расположены перинуклеарно. При остром колите их количество увеличено, цитоплазма одного нейрона субтотально заполнена гранулами каспазы-3 (стрелка). Продольные гистологические срезы, конфокальная микроскопия. Ув. 640

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к HuC/D нейронов миентерального сплетения на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

На тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки при остром колите, как и в контроле нейроны располагались в виде полосовидных кластеров (рис. 55 А, Б, 56 Б, 57 Б). Кроме крупных вытянутых ганглиев встречались небольшие ганглии треугольной формы, содержащие от 1 до 4 нейронов. Нейроны были округлыми, полигональными или треугольными, интенсивность свечения их цитоплазмы варьировала (рис. 57 Б).

При остром колите на качественном уровне и по данным морфометрического исследования отмечено увеличение количества нейронов в поле зрения (табл. 10, 56 А, Б, рис. 58).

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к S100b глиальных клеток миентерального сплетения на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

ИФ исследование с антителами к S100b было проведено на тотальных препаратах мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки, что позволило выявить глиальные клетки и их отростки. В составе миентеральных ганглиев и нервных трактов выявлялись внутриганглионарные и межганглионарные глиальные клетки (рис. 55 А, Б, 57 Б), в пространстве между ганглиями и циркулярном слое мышечной оболочки по ходу нервных волокон располагались внутримышечные глиальные клетки (рис. 55 А, В).

Глиальные клетки имели интенсивно светящееся тело с небольшим ядром, отростки внутриганглионарных и межганглионарных глиальных клеток обильно ветвились, образуя нейропиль, внеганглионарные глиальные клетки имели два отростка, располагающихся по ходу нервных волокон. На границе между циркулярным слоем мышечной оболочки и подслизистой основы также визуализировались глиальные клетки (рис. 55 Г).

Количественные показатели глиальных клеток на тотальных препаратах не различались между группами мышей с острым колитом и контрольной, в то время как нейрон-глиальный индекс при остром колите возрос (табл. 10, рис. 58).

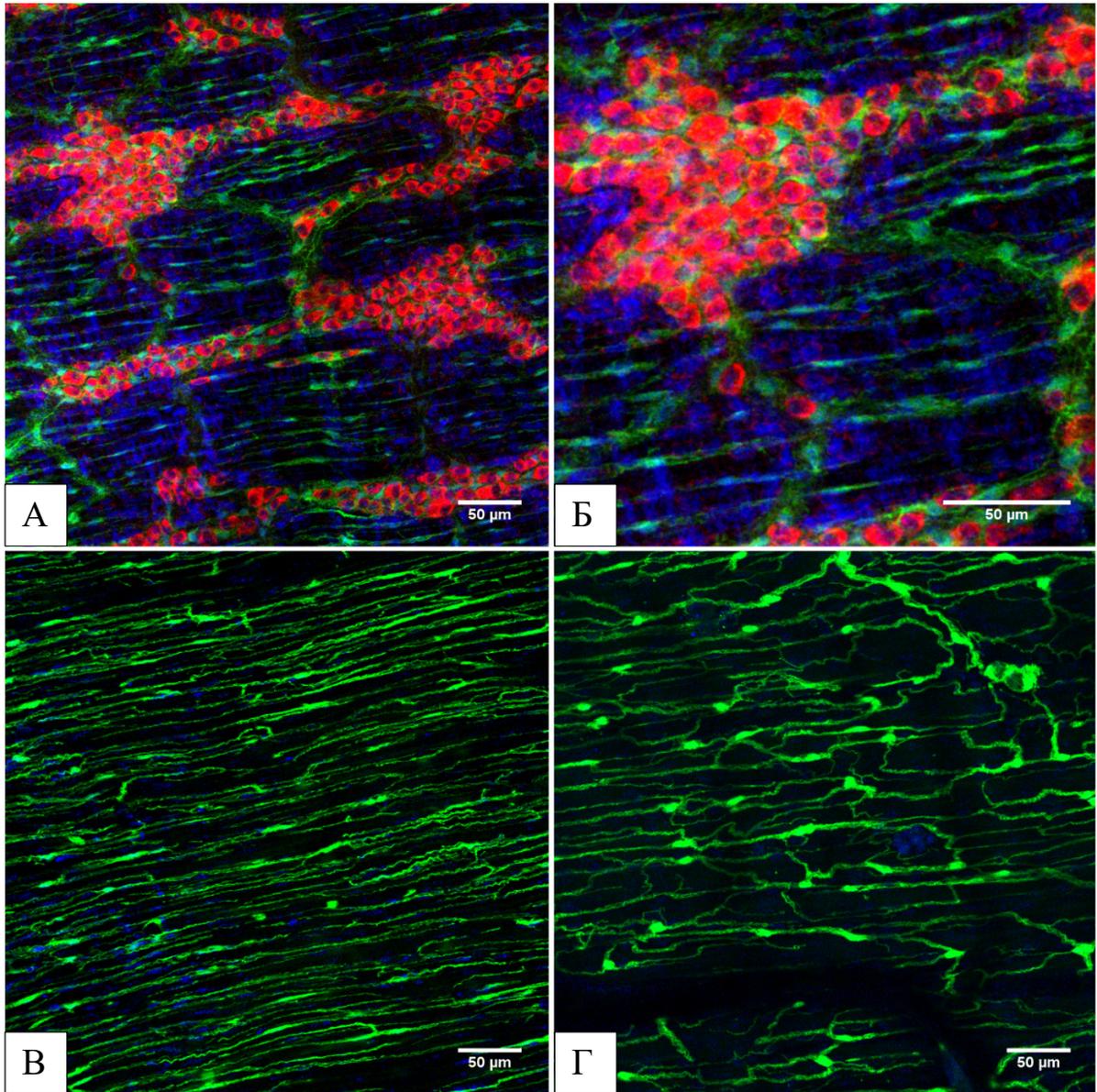


Рис. 55. Острый колит. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированные антителами к паннейрональному маркеру NuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к S100b и FITC (зеленое свечение) и (синее свечение). А – миентеральные ганглии. Тела нейронов окружены глиальными клетками. В пространствах между ганглиями располагаются глиальные клетки по ходу нервных волокон; Б – глиальные клетки в циркулярном слое мышечной оболочки. Отростки глиальных клеток располагаются параллельно циркулярному слою мышечной оболочки; В – глиальные клетки на границе циркулярного слоя мышечной оболочки и подслизистой основы. Конфокальная микроскопия

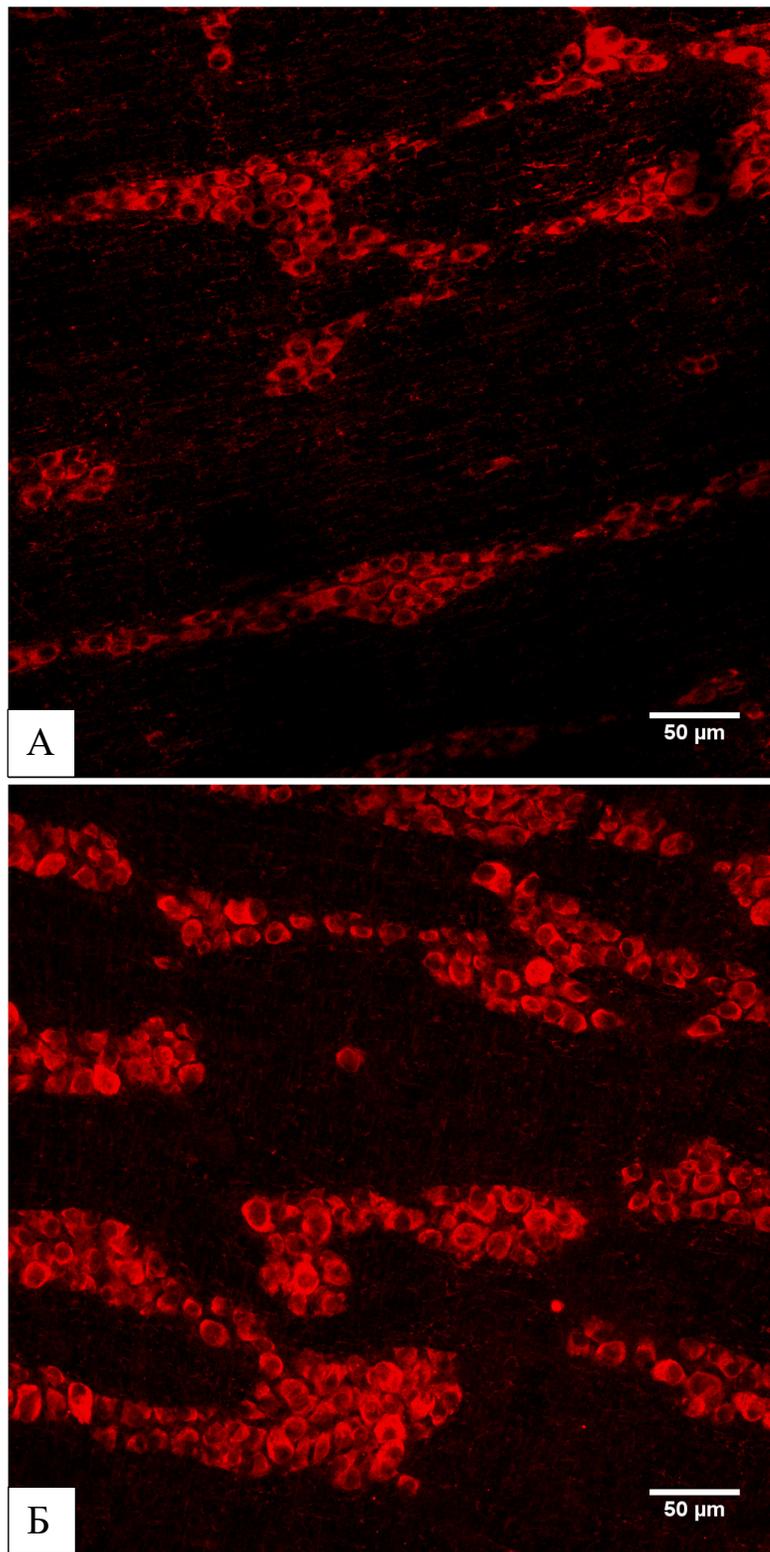


Рис. 56. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки при остром колите, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение) и DAPI (синее свечение) у мышей контрольной группы (А) и при остром колите (Б). При остром колите количество нейронов увеличено. Конфокальная микроскопия

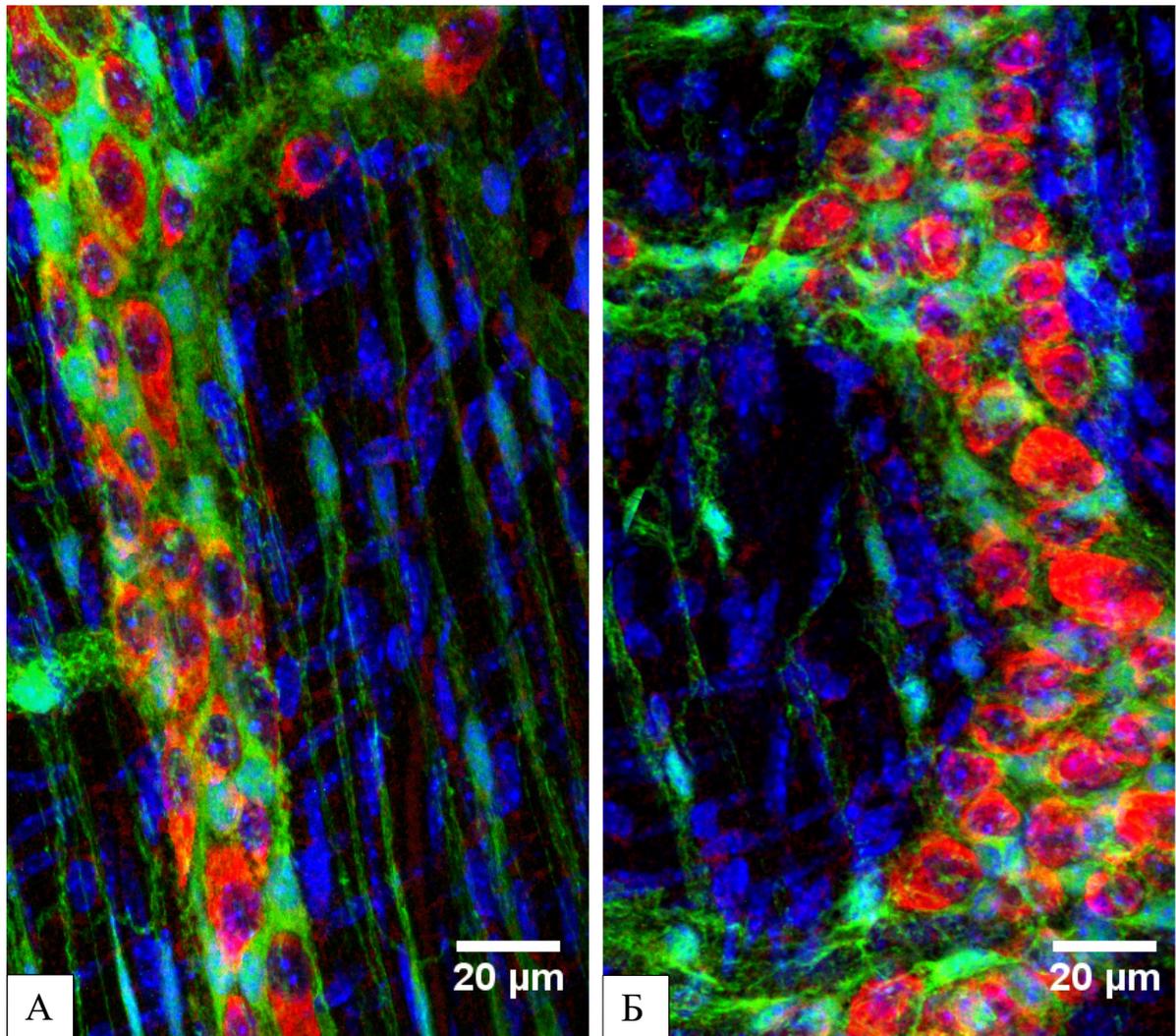


Рис. 57. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и при остром колите (Б), маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к S100b и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В миентеральных ганглиях выявляются нейроны и глиальные клетки, в межганглионарных пространствах локализованы внутримышечные глиальные клетки. При остром колите число миентеральных нейронов увеличено, а миентеральные ганглии деформированы. Конфокальная микроскопия

Количество маркированных антителами к HuC/D нейронов и к S100b глиальных клеток в миентеральных ганглиях на тотальных препаратах в контрольной группе и при остром колите, Me (25L;75U)

Параметры	Контрольная группа	Острый колит	p
HuC/D			
Количество нейронов на 0.18 мм ² площади	133.50 (125.00;190.00)	230.50 (214.75;259.38)	0.02
S100b			
Количество глиальных клеток в ганглиях на 0.18 мм ² площади	128.00 (112.50;196.50)	145.25 (121.88;169.75)	0.86
Нейрон-глиальный индекс	0.99 (0.97;1.19)	1.67 (1.31;1.95)	0.045
Количество глиальных клеток в циркулярном слое мышечной оболочки на 0.18 мм ² площади	72.50 (54.00;102.00)	65.50 (60.50;66.50)	0.91

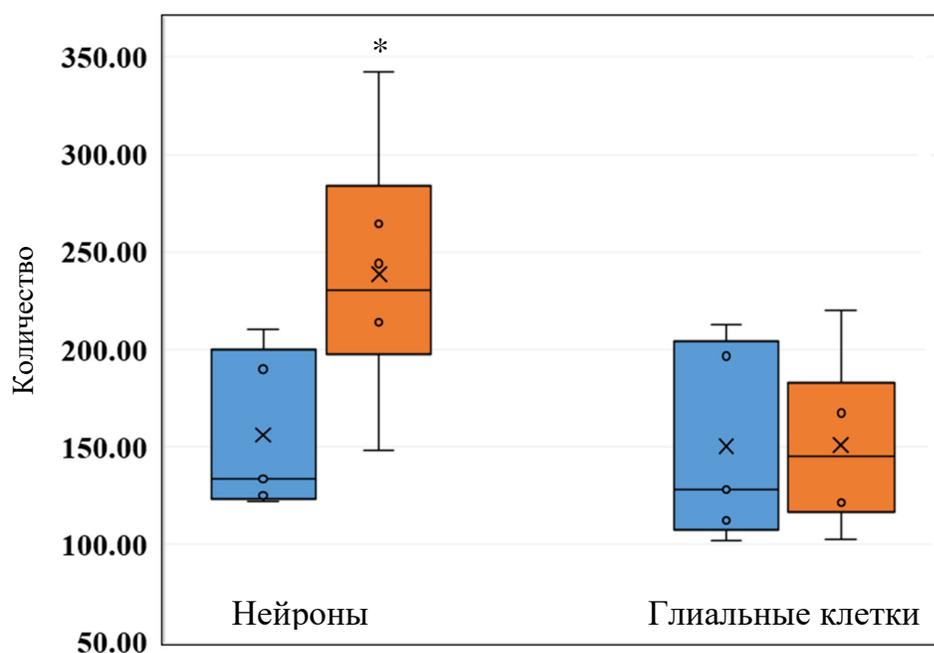


Рис. 58. Количество нейронов и глиальных клеток в миентеральных ганглиях на площади на 0.18 мм² площади препаратов, маркированных антителами к HuC/D и S100b у мышей контрольной группы и с острым колитом, ■ - контрольная группа, ■ - острый колит
* - p<0.05

Гистоархитектоника маркированных антителами к β III-тубулину миентерального и субмукозного сплетений на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

ИФ исследование тотальных препаратов мышечной и слизистой оболочки дистального отдела ободочной кишки было проведено у мышей с острым колитом с применением антител к паннейрональному маркеру β III-тубулину. Гистоархитектоника миентерального нервного сплетения была представлена несколькими типами:

- Сеть средней плотности (рис. 59 А): миентеральные ганглии среднего размера и клеточности, нервные тракты средней длины и толщины, межганглионарные пространства полигональной формы.
- Сеть разреженная (рис. 59 Б, Г): миентеральные ганглии среднего или небольшого размера, соединяющие их нервные тракты длинные и тонкие. Межганглионарные пространства визуально увеличены, полигональной формы.
- Сеть гипертрофическая (рис. 59 В): миентеральные ганглии резко увеличены в размерах, количество клеток в них также увеличено. Нервные тракты обычной толщины или тонкие, короткие.

Нервные тракты были или прямыми (рис. 60 А), или волнообразной формы (рис. 60 Б). По сравнению с мышами контрольной группы у мышей с острым колитом отмечалось изменение гистоархитектоники миентерального сплетения: сеть имела тенденцию к разреженности, с преобладанием волнообразных нервных трактов (рис. 61 А, Б). При остром колите уменьшилась средняя толщина нервных трактов (табл. 11). Внутримышечные нервные волокна на качественном уровне не различались у животных контрольной группы и с острым колитом. При морфометрическом анализе такие показатели как площадь, отношение периметра к площади, число ветвлений и средняя толщина сети миентеральных ганглиев и внутримышечных волокон не различались между животными контрольной группы и с острым колитом (табл. 11).

При ИФ исследовании тотальных препаратов слизистой оболочки дистального отдела ободочной кишки с использованием антител к паннейрональному маркеру β III-тубулину у мышей опытной группы по сравнению с контрольной выявлялось резкое изменение гистоархитектоники подслизистого сплетения – нервные волокна, иннервирующие СПСО, были утолщены, деформированы, хаотично расположены, общее их количество возросло (рис. 62 Б, 63).

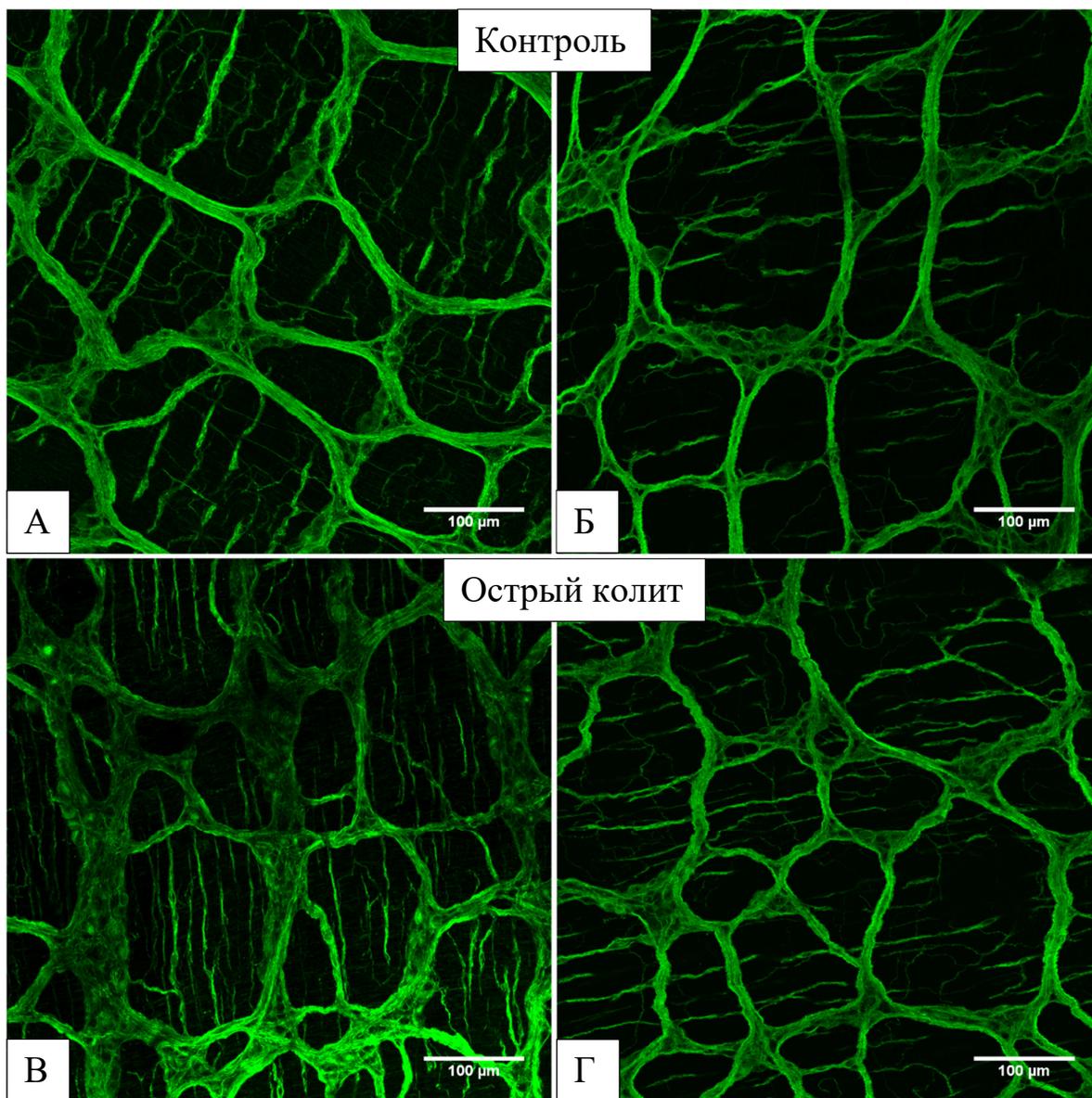
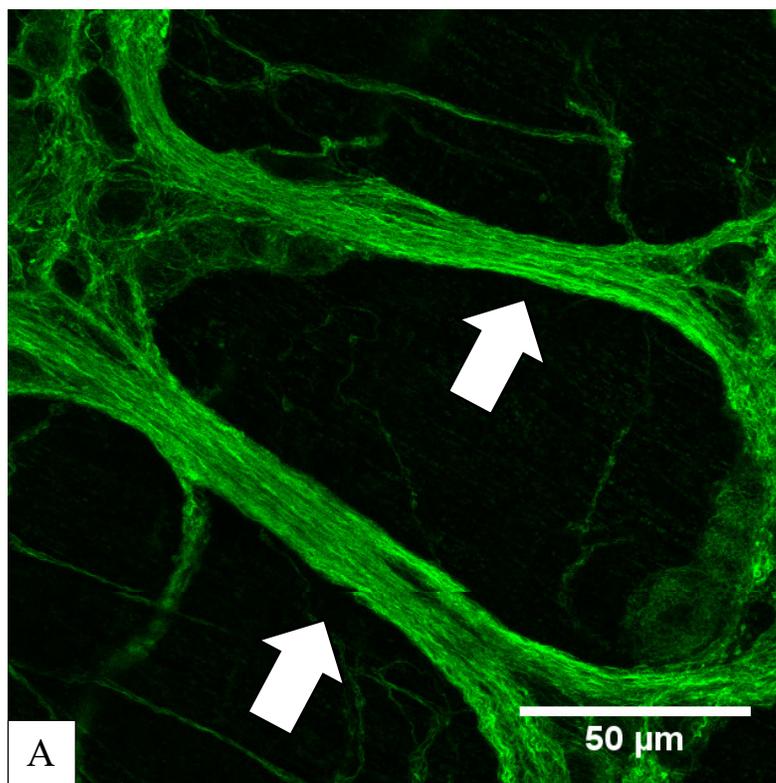


Рис. 59. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мышей контрольной группы (А, Б) и при остром колите (В, Г), маркированные антителами к паннейрональному маркеру β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение). А – сеть миентеральных ганглиев и нервных трактов средней плотности, нервные тракты прямые; Б – сеть миентеральных ганглиев и трактов разреженная, нервные тракты прямые; В – гипертрофия сети миентеральных ганглиев, их толщина и количество клеток в них увеличены, нервные тракты тонкие, волнообразные; Г – сеть миентеральных ганглиев и нервных трактов разреженная, нервные тракты волнообразные. Конфокальная микроскопия

Контроль



Острый
КОЛИТ

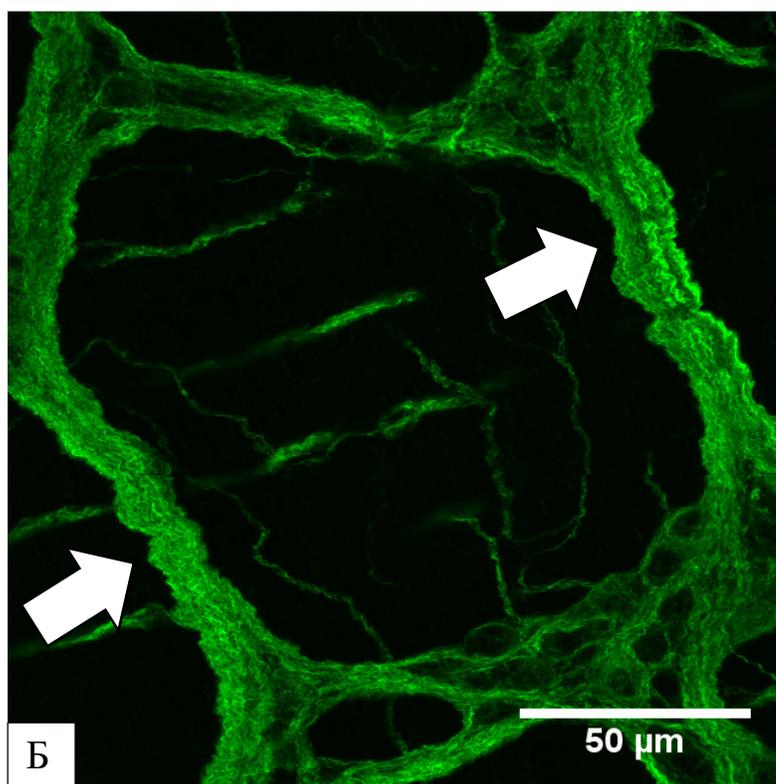


Рис. 60. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки мышей, маркированные антителами к паннейрональному маркеру β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение). Нервные тракты (А) у мыши контрольной группы и волнообразные (Б) у мыши с острым колитом на тотальных препаратах мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки. Конфокальная микроскопия

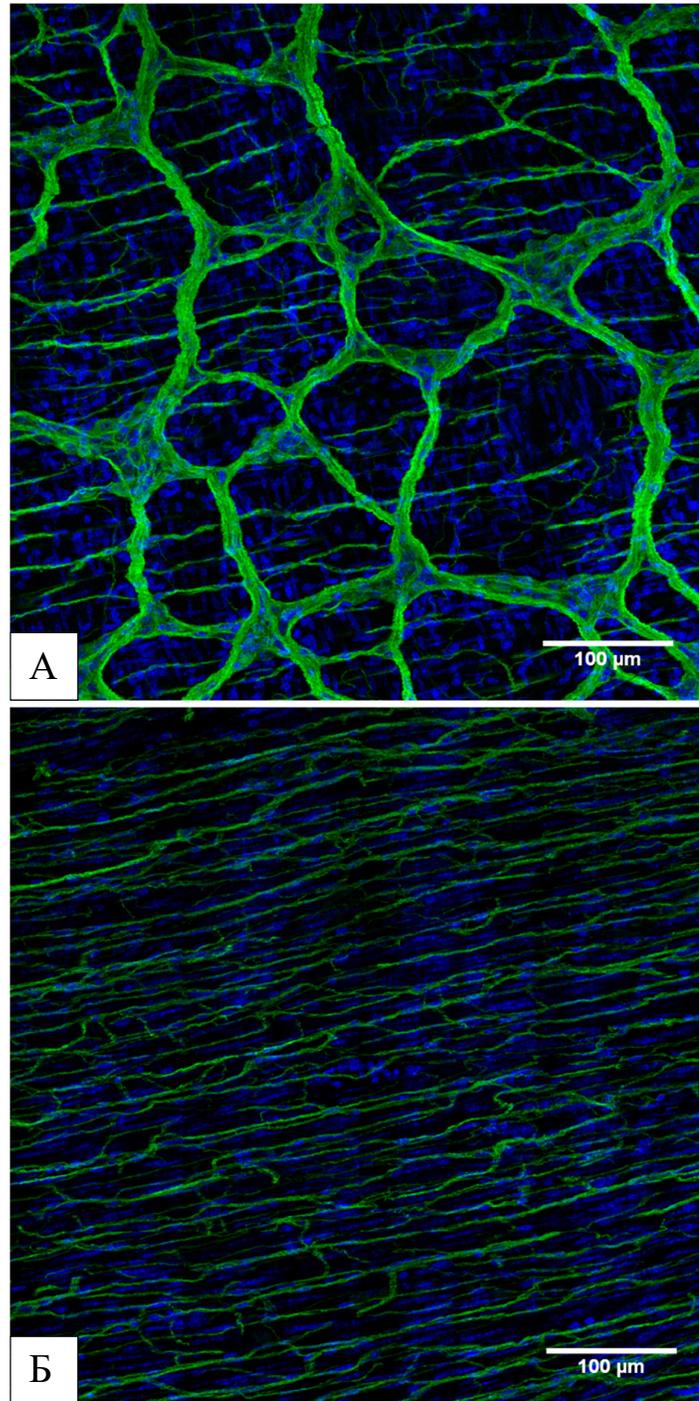


Рис. 61. Острый колит. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированные антителами к паннейрональному маркеру β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). А – миентеральные ганглии и нервные тракты. В миентеральных ганглиях нейроны и ядра глиальных клеток; Б – внутримышечные нервные волокна в циркулярном слое мышечной оболочки. Нервные волокна различного диаметра идут параллельно циркулярному слою мышечной оболочки. Конфокальная микроскопия

Таблица 11

Количество маркированных антителами к β III-тубулину миентеральных ганглиев и нервных волокон в циркулярном слое мышечной оболочки на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки в контрольной группе и при остром колите, Me (25L;75U)

Параметры	Группа	Контрольная группа	Острый колит	p
Миентеральные ганглии и нервные тракты				
Относительная площадь ганглиев, %		25.43 (24.91;29.17)	26.35 (25.20;27.68)	0.91
Отношение периметра к площади		30.43 (29.17;30.62)	29.00 (28.67;29.86)	0.76
Количество ветвлений ганглиев и нервных трактов		41.00 (34.00;48.00)	47.00 (45.00;54.00)	0.34
Средняя толщина нервных трактов, мкм		16.23 (16.21;17.21)	13.58 (13.06;14.13)	0.03
Нервные волокна в циркулярном слое мышечной оболочки				
Относительная площадь волокон, %		23.64 (23.04;25.21)	25.31 (23.95;26.51)	0.46
Средняя толщина волокон, мкм		3.17 (3.14;3.32)	2.93 (2.86;3.00)	0.17

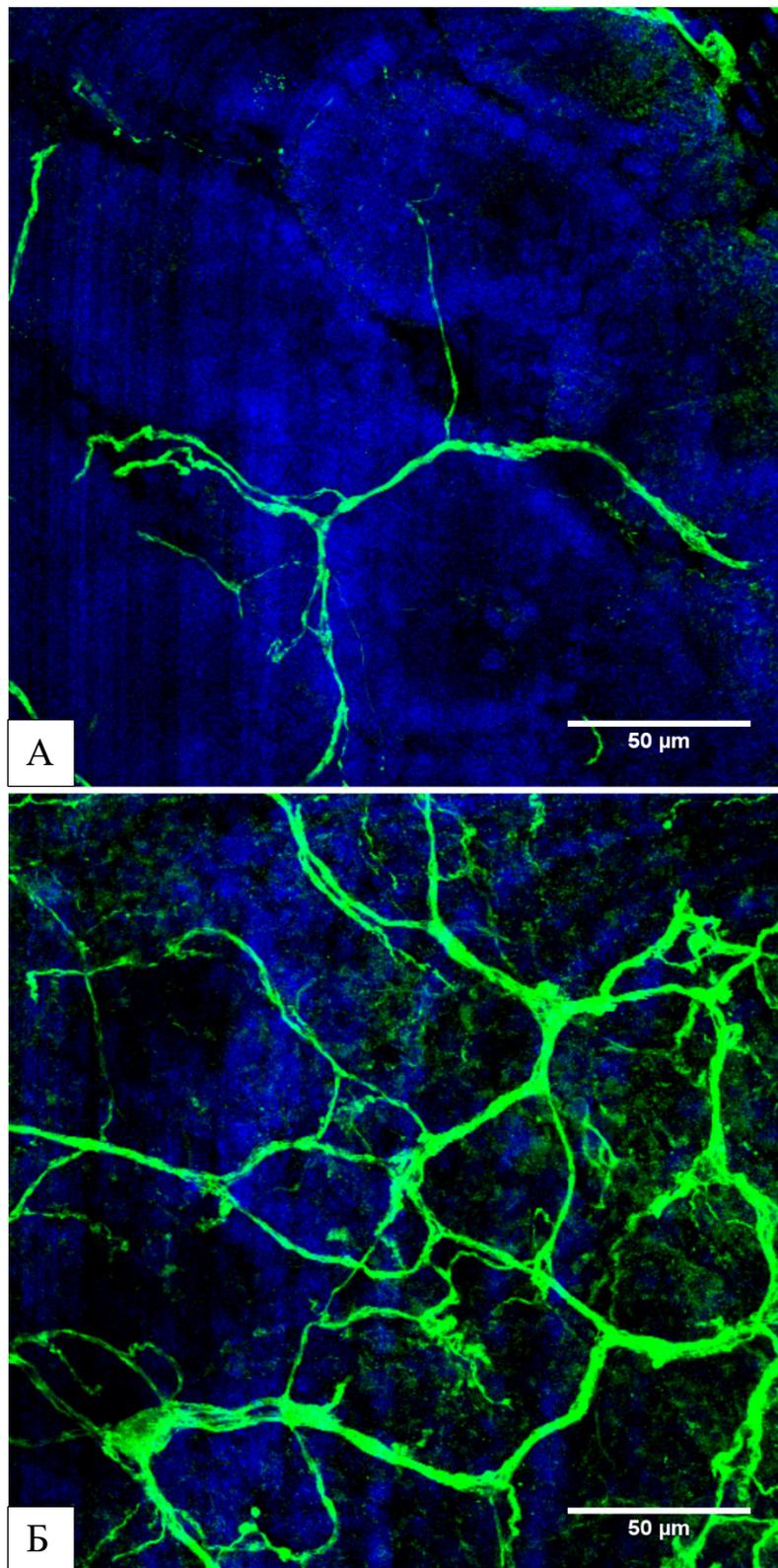


Рис. 62. Тотальные препараты слизистой оболочки дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и при остром колите (Б), маркированные антителами к паннейрональному маркеру β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). Волокна утолщены, деформированы, хаотично расположены. Конфокальная микроскопия

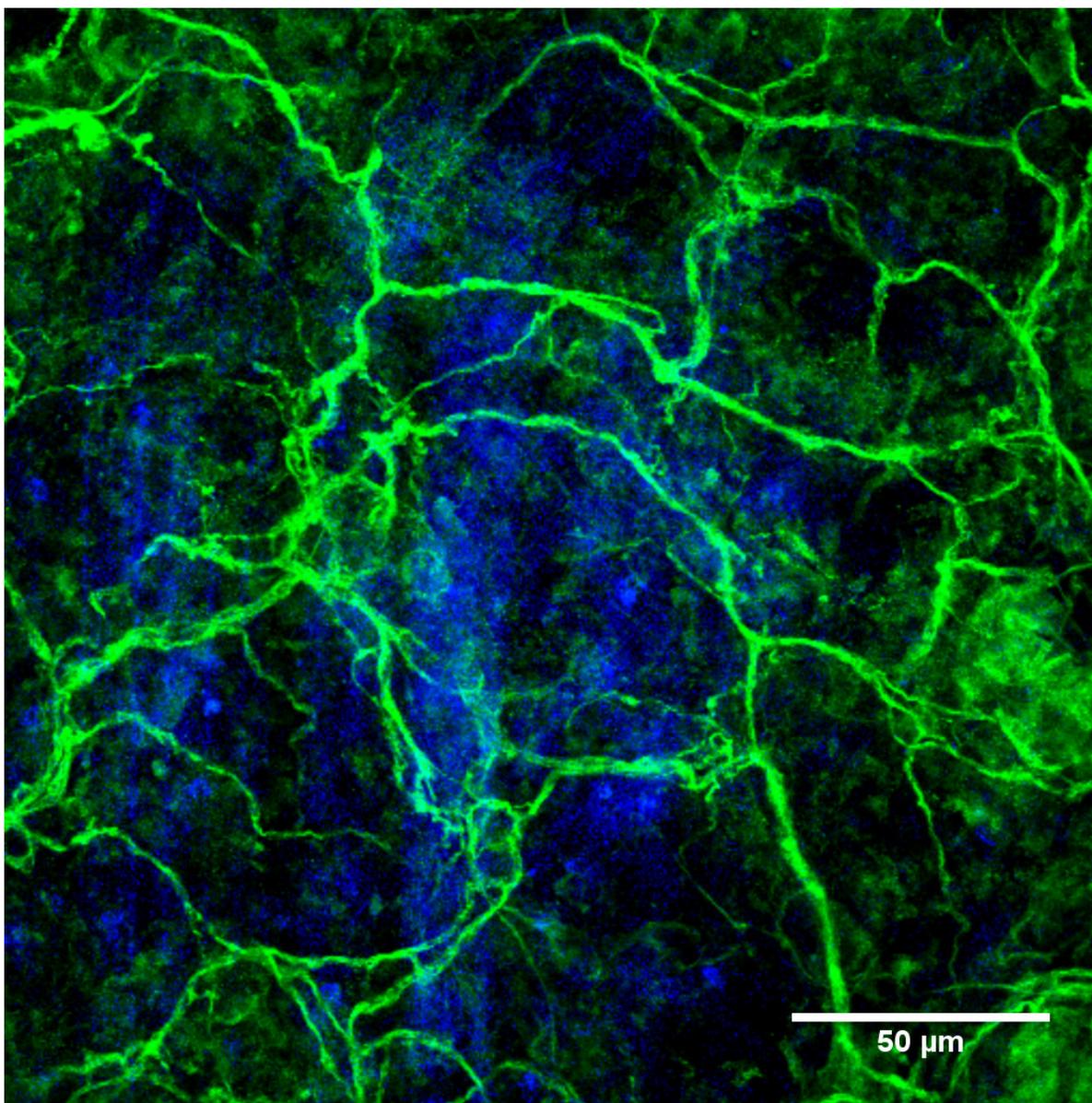


Рис. 63. Острый колит. Тотальные препараты слизистой оболочки дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированные антителами к паннейрональному маркеру β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). Волокна утолщены, деформированы, хаотично расположены. Конфокальная микроскопия

Ультраструктурная характеристика миентерального и субмукозного сплетений ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при остром колите

При остром колите вокруг миентеральных ганглиев и внутримышечных нервных волокон чередовались участки с нормально и хаотично расположенными разреженными коллагеновыми волокнами, а также зоны, не содержащие волокон. Миентеральные ганглии у мышей с острым колитом, как и в контрольной группе, состояли из тел глиальных клеток, нейронов и образованного их отростками нейропиля (рис. 64). Межклеточное вещество было представлено в небольшом объеме. Нейроны с ультраструктурными проявлениями некроза не выявлялись, но определялись отдельные аксоны с признаками некроза, которые располагались среди сохранных аксонов и были либо пустыми, либо заполнены клеточным детритом. На большем протяжении нейропиля такие аксоны были единичными. Выявленные ультраструктурные изменения сходны с таковыми при валерияновой дегенерации. По общему строению внутримышечные нервные волокна не отличались от таковых у мышей контрольной группы. В составе нервных волокон, как и в нейропиле ганглиев, выявлялись отдельные глиальные клетки и аксоны с признаками дегенерации.

Волокна субмукозного сплетения, окруженные дезорганизованными коллагеновыми фибриллами, были относительно сохранными, несмотря на выраженное воспаление и значительный отек межклеточного вещества (рис. 65).

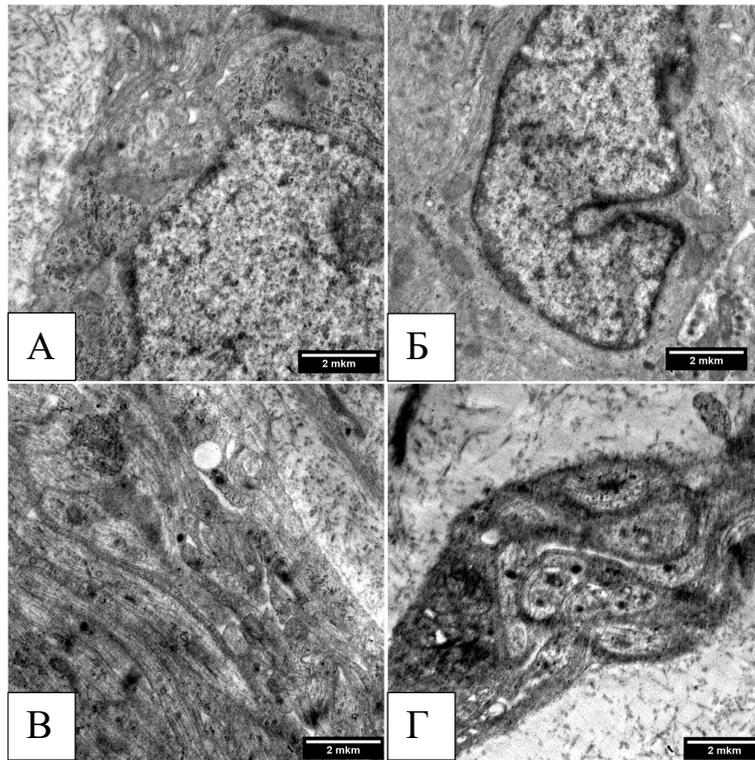


Рис. 64. Острый колит. Ультраструктурная характеристика миентерального сплетения ободочной кишки мышей. А – ядро и цитоплазма нейрона в миентеральном ганглии. Альтеративные изменения отсутствуют; Б – тело и цитоплазма глиальной клетки в миентеральном ганглии; В – нейропиль миентерального ганглия; Г – внутримышечное нервное волокно. Выраженный отек межклеточного вещества с дезорганизацией коллагеновых волокон. Электронная микроскопия. Ув. 10 000

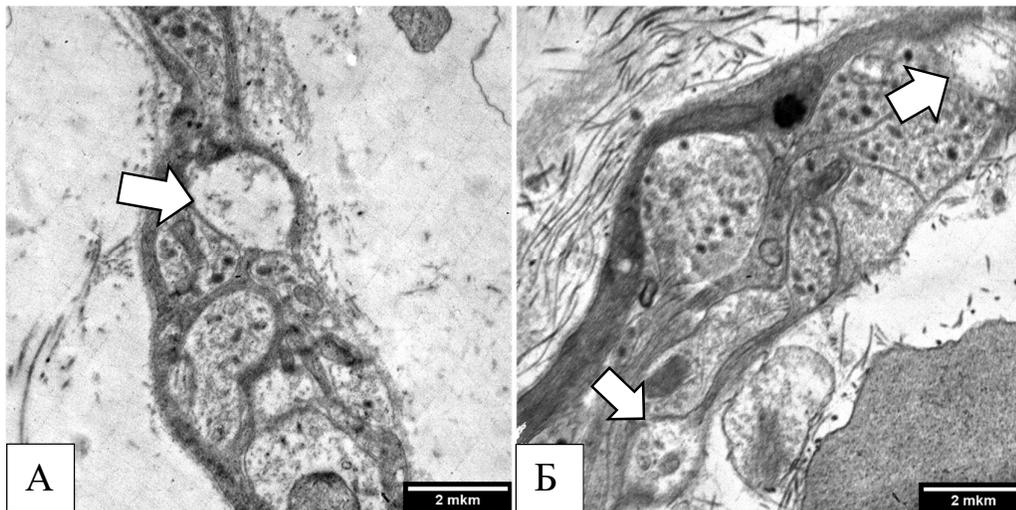


Рис. 65. Острый колит. Ультраструктурные изменения субмукозного сплетения ободочной кишки мышей. А – нервное волокно в пространстве между криптами в СПСО. Выраженный отек межклеточного вещества и дезорганизация коллагеновых волокон. Один профиль аксона расширен, опустошен (стрелка); Б – нервное волокно в подслизистой основе. Альтеративные изменения умеренно выражены, отмечается опустошение некоторых аксонов (стрелка). Электронная микроскопия. Ув. 10 000

Таким образом, при остром колите, индуцированном ДСН, у самцов мышей С57В1/6 на фоне уменьшения длины кишки на 40% в 4 раза возросло количество миентеральных ганглиев на единицу длины ободочной кишки, на 73% - число миентеральных нейронов на единицу площади, на 21% площадь и на 27% количество внутримышечных β III-тубулин-положительных нервных волокон.

Отмечались выраженные морфофункциональные изменения миентеральных нейронов: их размеры уменьшались на 12%, доля гипохромных нейронов снизилась на 40%, нитрергических нейронов на 27%, но возросло число нейронов с большим количеством гранул каспазы-3. Нервные тракты в миентеральном сплетении при остром колите извитые, их толщина снижена на 16%. При ультраструктурном исследовании выявлена дегенерация отдельных аксонов миентерального сплетения.

Нейрон-глиальное отношение в миентеральных ганглиях на тотальных препаратах увеличилось в 1.7 раз, а число глиальных клеток на окрашенных по Ниссию гистологических срезах уменьшилось на 20%, что в целом отражает уменьшение количества глиальных клеток при остром колите. Средний диаметр глиальных клеток в циркулярном слое мышечной оболочки сократился на 15%, а их площадь и количество не изменились.

При остром колите изменения субмукозного сплетения были более выражены, чем миентерального и характеризовались увеличением в 3.7 раза площади, в 2.9 раза количества и на 18% среднего диаметра β III-тубулин-положительных нервных волокон в СПСО. Число S100b-позитивных клеток в СПСО возросло в 5 раз. При ультраструктурном исследовании выявлены альтеративные изменения отдельных аксонов миентерального и субмукозного сплетений.

3.3. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

Клинические проявления хронического колита у самцов мышей C57Bl/6

Масса тела мышей с хроническим колитом в начале и после окончания эксперимента не отличалась от таковой у мышей контрольной группы. Клинические проявления хронического колита были минимальными: у четверти мышей во время употребления ДСН при внешнем осмотре отмечалось небольшое загрязнение фекалиями анальной области.

Функциональные изменения желудочно-кишечного тракта у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

В сравниваемых группах показатели доли сухого остатка фекалий статистически значимо не различались и составляли 42.36 (35.82;44.13) % и 46.75 (36.99;48.46) % у мышей с хроническим колитом и контрольной группы соответственно, $p=0.35$. Время транзита красителя кармина красного через ЖКТ статистически значимо увеличилось у мышей с хроническим колитом и составило 209 (208;212) мин, а в контрольной группе – 131 (100;190) мин, $p<0.05$.

Таким образом, при хроническом колите у мышей абсорбционная функция толстого кишечника не нарушена, а моторная функция замедлена.

Макроскопическая характеристика ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

Ободочная кишка у мышей с хроническим колитом была бледно-розовой окраски и заполнена содержимым пастообразной консистенции желто-бурого цвета. В дистальном отделе кишечное содержимое было более оформленным, чем в проксимальном, но сохраняло мягкую консистенцию. Длина кишки у мышей опытной и контрольной группы не различалась и составила, соответственно, 5.5 (5.5;5.5) см и 6.0 (5.5;6.5) см, $p=0.94$.

Микроскопическая характеристика ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

В контрольной группе у одной мыши в СПСО и подслизистой основе ободочной кишки выявлялись немногочисленные скопления плазмоцитов. У остальных мышей каких-либо морфологических особенностей оболочек ободочной кишки не выявлено (рис. 66 А, В). У мышей с хроническим колитом на всем протяжении длины ободочной кишки обнаружен хронический воспалительный процесс (рис. 66 Б, Г).

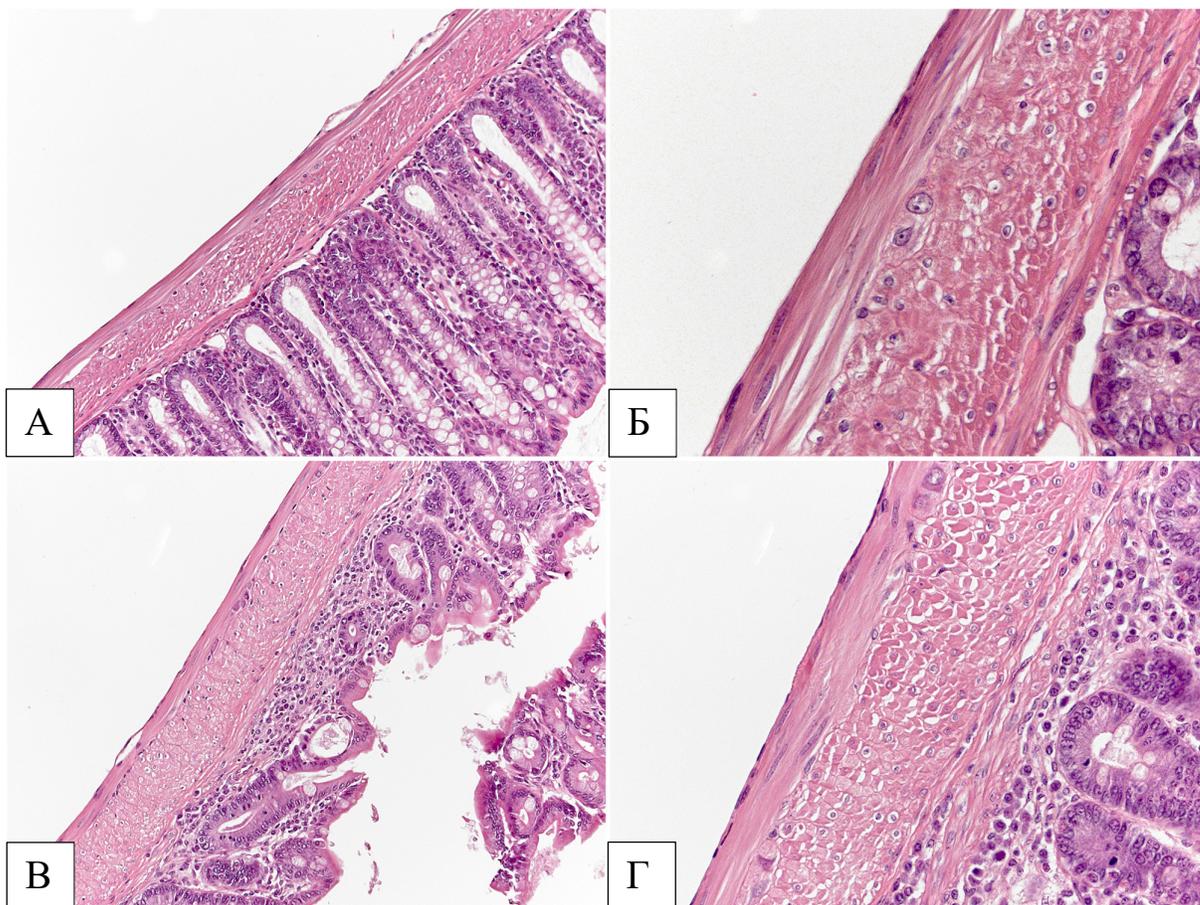


Рис. 66. Ободочная кишка у мыши контрольной группы (А, Б) и при хроническом колите (В, Г). А, Б - эпителиальная выстилка сохранена, крипты с узкими просветами. Подслизистая основа представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, в СПСО небольшое количество клеточных элементов; В, Г - в СПСО эпителизированная язва, крипты по ее краям с регенераторными изменениями. Полосовидная воспалительная инфильтрация в базальном отделе СПСО и подслизистой основе. Воспалительные изменения в мышечной оболочке отсутствуют. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 100 (А, В), 200 (Б, Г)

В СПСО между участками с сохраненными криптами и эпителиальной выстилкой располагались небольшие эпителизированные язвы, в этих зонах крипты отсутствовали, отмечался фиброз и плазмоцитарно-лимфоцитарная инфильтрация. По краям язв крипты были с регенераторными изменениями: их просвет был деформирован, а количество бокаловидных клеток среди эпителиоцитов уменьшено. Отмечалась выраженная плазмоцитарно-лимфоцитарная инфильтрация СПСО, более интенсивная в базальных отделах. В подслизистой основе плазмоцитарно-лимфоцитарный воспалительный инфильтрат образовывал полосовидные скопления по ходу кровеносных и лимфатических сосудов (рис. 67). В мышечной оболочке воспалительные изменения отсутствовали (рис. 66 Г, 67). Показатели толщины мышечной оболочки в дистальном отделе ободочной кишки статистически значимо не различались между группами и составили у контрольной группы 89.25 (88.81;115.05) мкм, а при хроническом колите – 117.84 (106.89;119.12) мкм, $p=0.25$.

Морфологическая характеристика миентерального и субмукозного сплетений в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, при хроническом колите миентеральное сплетение на качественном уровне не отличалось от контрольной группы и было представлено ганглиями, образующими цепочку между циркулярным и продольным слоями мышечной оболочки (рис. 68). Ганглии имели вытянутую форму и состояли из нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток. По форме, клеточному составу и строению нейропиля миентеральные ганглии при хроническом колите не отличались от контрольной группы.

При окрашивании по методу Ниссля при хроническом колите в миентеральных ганглиях выявлялись нейроны различной хромности с ядром центрального и нецентрального сечения или без ядра, глиальные и неидентифицируемые клетки (рис. 69 А). На качественном уровне различий между мышцами с хроническим колитом и контрольной группы не было.

Субмукозные ганглии на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и по Ниссля, при хроническом колите не отличались от контрольной группы и состояли из нейронов, глиальных и неидентифицируемых клеток (рис. 69 Б). Их количество было больше в проксимальном отделе ободочной кишки, где они располагались в основании складок слизистой оболочки.

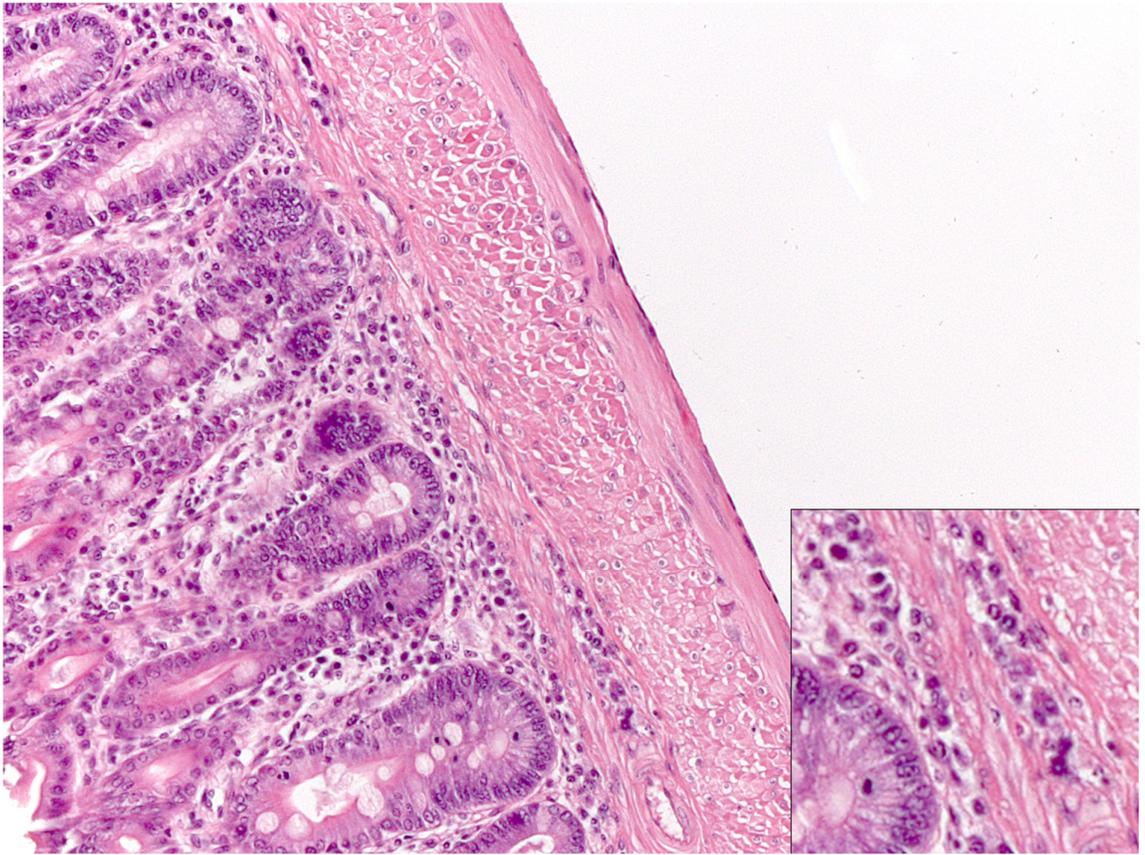


Рис. 67. Хронический колит. Ободочная кишка мыши. Полосовидная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация (врезка) подслизистой основы и СПСО. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 200

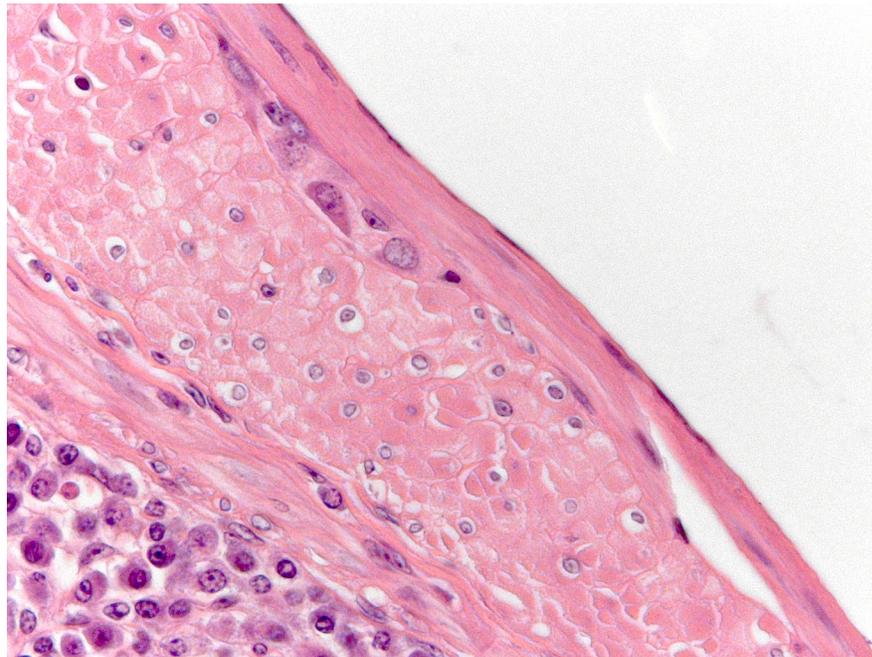


Рис. 68. Хронический колит. Энтеральный ганглии ободочной кишки с нейронами и глиальными клетками. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.400

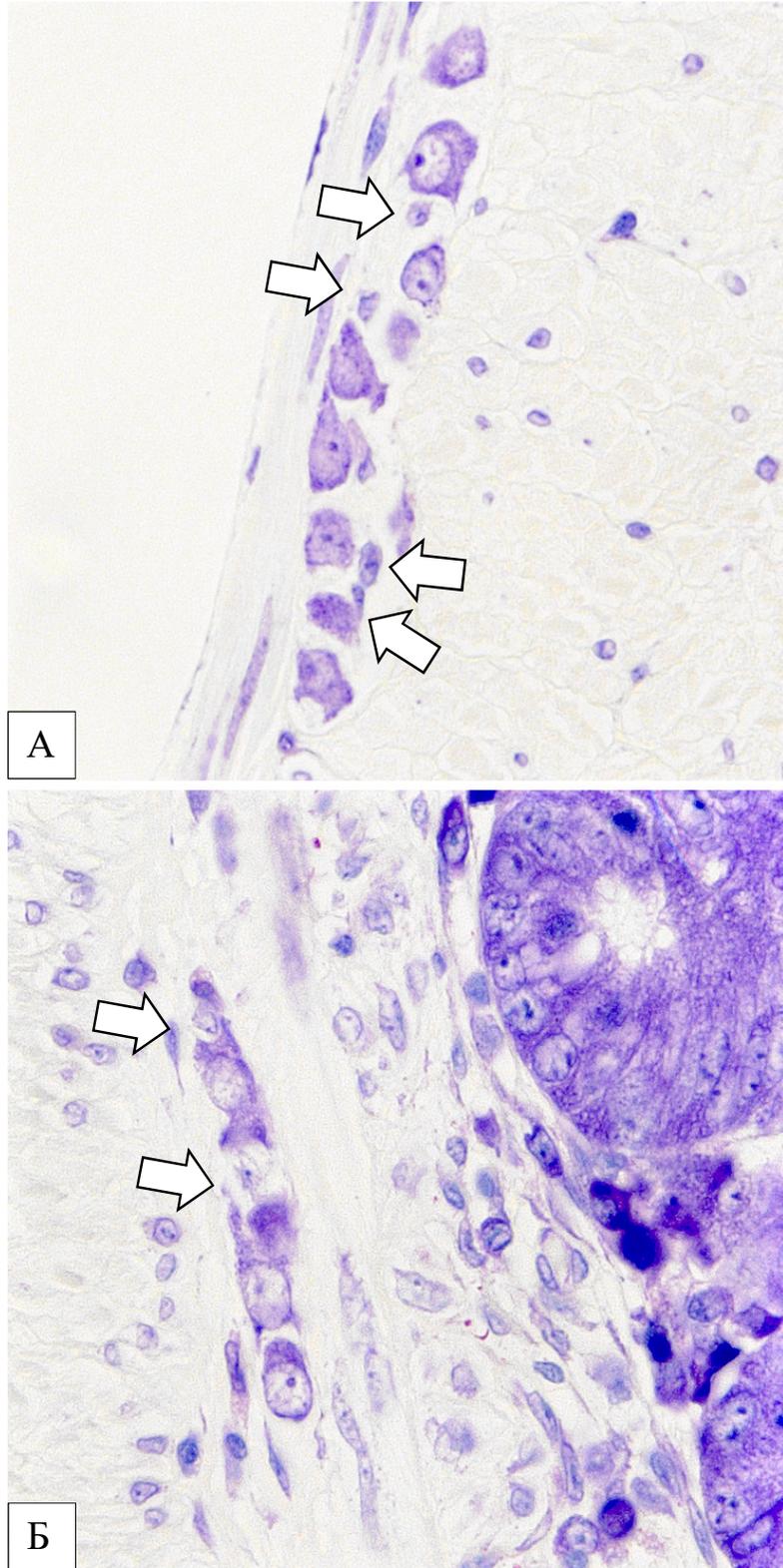


Рис. 69. Хронический колит. Миентеральный (А) и субмукозный (Б) ганглии ободочной кишки, в них нейроны и глиальные клетки (стрелки). Окрасивание по методу Ниссля. Ув. 640

В дистальном отделе ободочной кишки субмукозные ганглии были единичными. Также, как и при остром, при хроническом колите субмукозные ганглии были окружены клетками воспалительного инфильтрата, но в ганглиях воспалительная инфильтрация отсутствовала.

При окрашивании пикросирисусом красным миентеральные ганглии были окружены тонкой соединительнотканной оболочкой, имеющей желто-зеленый цвет, что характерно для незрелого коллагена. Соединительная ткань подслизистой основы окружала субмукозные ганглии и была интенсивно красного цвета, что характерно для зрелого коллагена.

Количественная характеристика энтеральных ганглиев и клеточного состава миентеральных ганглиев в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

По сравнению с контрольной группой при хроническом колите снизилось количество миентеральных ганглиев в проксимальном и субмукозных в дистальном отделе (табл. 12). В миентеральных ганглиях дистального отдела увеличивалась относительная доля гиперхромных нейронов, а в медиальном отделе уменьшился размер миентеральных нейронов и их ядер, в то время как их ядерно-цитоплазматический индекс возрос (табл. 13, 14).

Морфологическая характеристика маркированного антителами к β III-тубулину и S100b миентерального сплетения дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

Проведено ИГХ и ИФ исследование продольных гистологических срезов дистального отдела ободочной кишки. При ИГХ исследовании с применением антител к β III-тубулину у мышей контрольной группы и с хроническим колитом в составе миентерального сплетения выявлялись ганглии и внутримышечные нервные волокна (рис. 70 Б, 71 А). Миентеральные ганглии состояли из нейропиля и тел нейронов. Внутримышечные волокна имели вид округлых или продолговатых профилей. На качественном уровне различий между мышами контрольной группы и с хроническим колитом не выявлено. S100b-положительные структуры при хроническом колите были локализованы там же, где и β III-тубулин-положительные, но в меньшем количестве (рис. 72 А). Наиболее интенсивное окрашивание наблюдалось в области локализации тел глиальных клеток в миентеральных ганглиях и по ходу нервных волокон. На качественном уровне различий между группами животных с хроническим колитом и контрольной не было обнаружено.

Таблица 12

Количество энтеральных ганглиев на 1 мм длины ободочной кишки у мышей C57Bl/6 контрольной группы и при хроническом колите, Me (25L;75U)

Ганглии	Сумма отделов		p	Проксимальный		p	Медиальный		p	Дистальный		p
	Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит	
Минтеральные	4.09 (3.93;4.34)	3.59 (2.95;3.89)	0.12	4.39 (4.13;5.09)	3.09 (2.18;3.32)	0.02	4.33 (3.70;4.66)	3.61 (3.59;4.04)	0.46	3.52 (3.50;3.72)	3.47 (3.16;4.45)	0.60
Субмукозные	0.59 (0.39;1.00)	0.28 (0.27;0.35)	0.18	0.75 (0.35;0.83)	0.63 (0.45;0.83)	0.92	0.16 (0.00;1.33)	0.16 (0.15;0.34)	0.75	0.36 (0.35;0.57)	0.00 (0.00;0.18)	0.03

Таблица 13

Клеточный состав миентеральных ганглиев ободочной кишки у мышей C57Bl/6 контрольной группы и с хроническим колитом, Me (25L;75U)

Отделы, группы	Сумма		р	Проксимальный		р	Медиальный		р	Дистальный		р
	Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит	
Клетки (число на ганглий)												
Нормохромные нейроны	0.69 (0.68;0.88)	0.74 (0.64;0.79)	0.46	0.70 (0.63;0.75)	0.85 (0.60;1.00)	0.60	0.90 (0.88;1.05)	0.60 (0.60;0.63)	0.14	0.83 (0.60;0.83)	0.75 (0.73;0.78)	0.46
Гипохромные нейроны	0.45 (0.38;0.45)	0.31 (0.28;0.38)	0.14	0.30 (0.28;0.40)	0.40 (0.33;0.50)	0.40	0.48 (0.30;0.65)	0.28 (0.23;0.40)	0.14	0.45 (0.45;0.60)	0.38 (0.25;0.38)	0.14
Гиперхромные нейроны	0.09 (0.08;0.10)	0.11 (0.11;0.16)	0.25	0.08 (0.08;0.08)	0.10 (0.05;0.20)	0.60	0.18 (0.15;0.20)	0.13 (0.03;0.20)	0.53	0.03 (0.03;0.05)	0.10 (0.08;0.25)	0.047
Все нейроны центрального сечения	1.21 (1.17;1.40)	1.23 (1.08;1.38)	0.60	1.00 (0.93;1.25)	1.65 (1.05;1.65)	0.12	1.65 (1.28;1.70)	1.08 (0.88;1.23)	0.08	1.10 (1.10;1.30)	1.18 (1.15;1.20)	0.60
Нейроны без ядрышка	0.45 (0.37;0.48)	0.40 (0.36;0.45)	0.68	0.40 (0.35;0.50)	0.45 (0.38;0.60)	0.60	0.40 (0.38;0.60)	0.33 (0.28;0.35)	0.21	0.38 (0.30;0.43)	0.40 (0.33;0.48)	0.68
Пикнотические нейроны	0.06 (0.06;0.06)	0.10 (0.06;0.18)	0.17	0.05 (0.03;0.08)	0.08 (0.05;0.33)	0.30	0.05 (0.03;0.05)	0.08 (0.05;0.18)	0.14	0.10 (0.05;0.10)	0.10 (0.08;0.10)	0.75
Нормохромные нейроны без ядра	1.04 (0.98;1.15)	0.92 (0.89;0.94)	0.08	1.15 (1.10;1.28)	1.10 (0.93;1.25)	0.83	1.15 (1.10;1.25)	1.10 (0.75;1.10)	0.24	0.83 (0.80;0.88)	0.75 (0.70;0.80)	0.08
Глиальные клетки	1.98 (1.81;2.09)	1.64 (1.61;1.78)	0.17	2.10 (2.00;2.13)	2.15 (2.08;2.28)	0.60	2.20 (1.83;2.63)	1.63 (1.38;2.00)	0.12	1.20 (1.18;1.63)	1.15 (1.10;1.35)	0.17
Нейрон-глиальное отношение	0.67 (0.62;0.67)	0.76 (0.73;0.78)	0.14	0.59 (0.44;0.78)	0.73 (0.73;0.73)	0.53	0.65 (0.58;0.67)	0.73 (0.56;0.75)	1.00	0.90 (0.68;0.94)	1.02 (0.85;1.16)	0.53

Таблица 14

Цитометрические показатели нейронов миентеральных ганглиев в разных отделах ободочной кишки у мышей C57Bl/6 в контрольной группе и при хроническом колите, Me (25L;75U)

Отделы группы	Сумма		p	Проксимальный		p	Медиальный		p	Дистальный		p
	Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит		Контрольная группа	Хронический колит	
Размеры												
Площадь сечения сомы нейронов, мкм ²	102.81 (98.60;104.78)	94.44 (79.22;100.15)	0.08	121.68 (107.74;136.30)	116.40 (86.05;132.25)	0.25	106.53 (94.75;126.24)	89.05 (77.04;92.76)	0.01	74.45 (70.98;84.66)	71.82 (70.27;85.70)	0.92
Площадь сечения ядра нейронов, мкм ²	50.63 (49.47;52.79)	50.23 (46.65;52.18)	0.17	59.01 (50.43;68.88)	59.08 (40.82;64.99)	0.60	48.20 (45.58;54.45)	45.34 (41.12;48.22)	0.047	46.15 (43.91;47.95)	47.02 (43.32;49.97)	0.92
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0.53 (0.52;0.54)	0.56 (0.56;0.56)	0.25	0.51 (0.50;0.51)	0.50 (0.50;0.52)	0.60	0.46 (0.45;0.49)	0.56 (0.56;0.57)	0.01	0.60 (0.59;0.66)	0.59 (0.57;0.63)	0.25

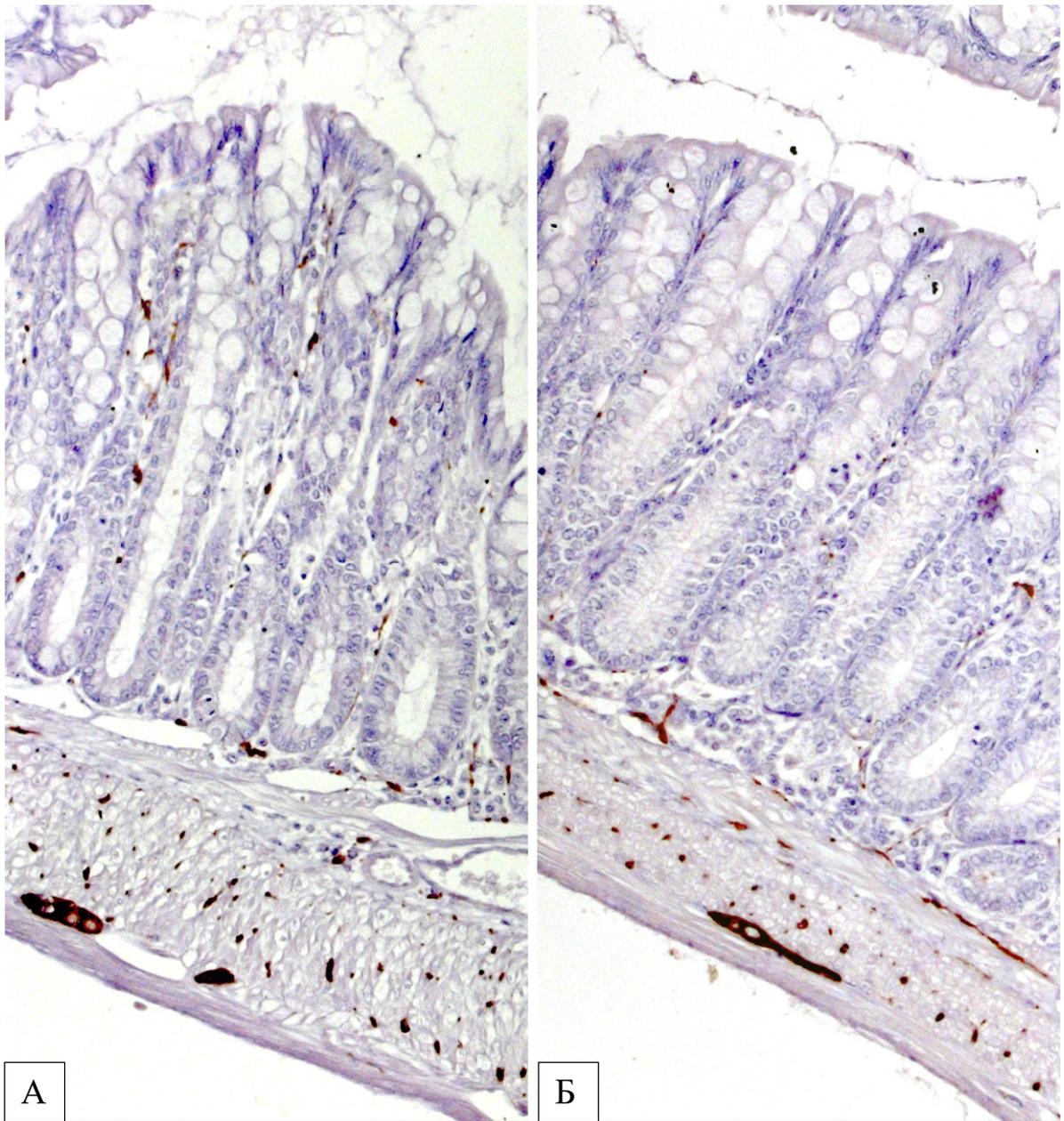


Рис. 70. Нервные волокна в мышечной оболочке СПСО дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и при хроническом колите (Б). На качественном уровне различий между группами нет. ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 200

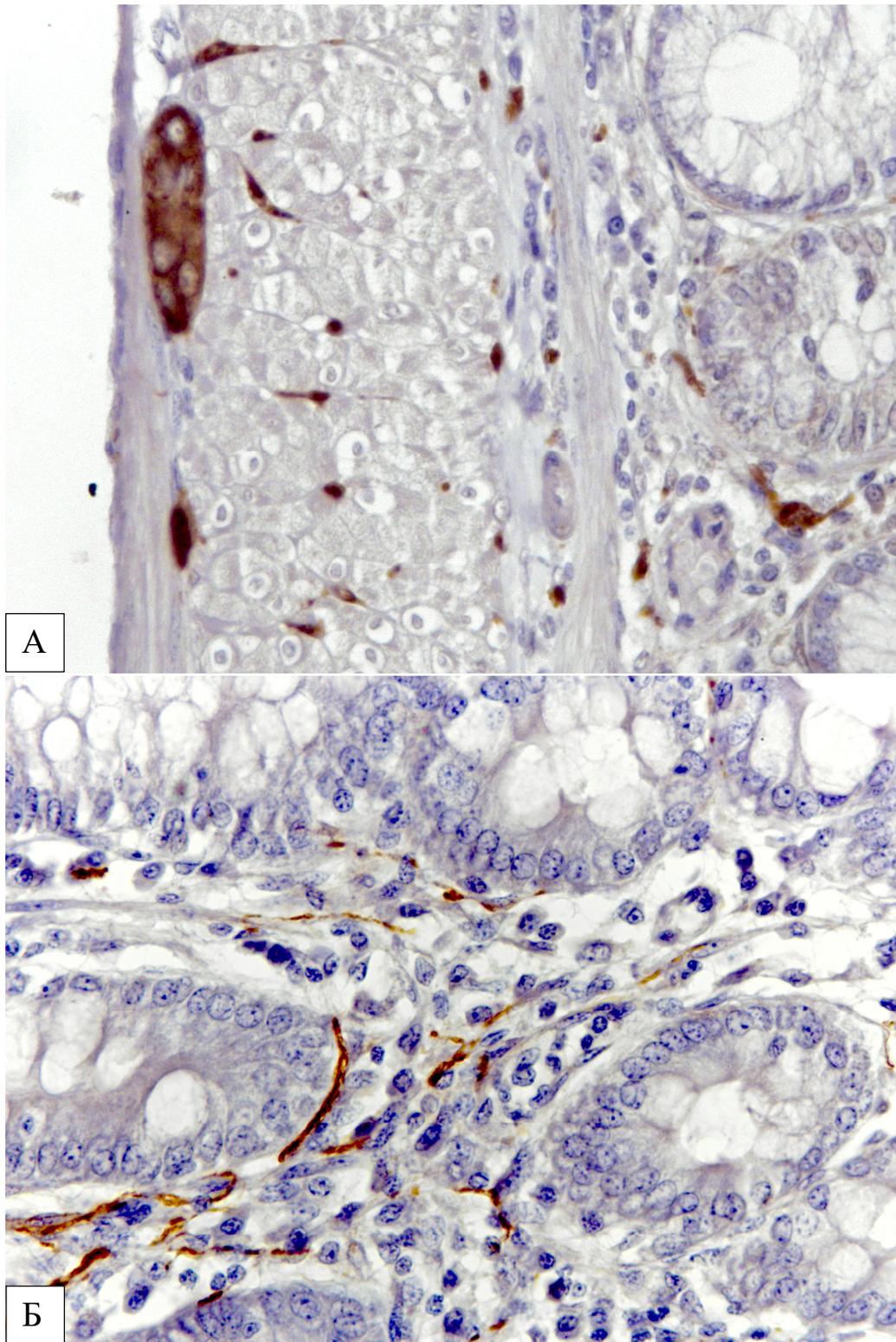


Рис. 71. Хронический колит. Нервные волокна в мышечной оболочке и СПСО дистального отдела ободочной кишки мыши. А – нервные волокна в циркулярном слое мышечной оболочки; Б – нервные волокна в СПСО. ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

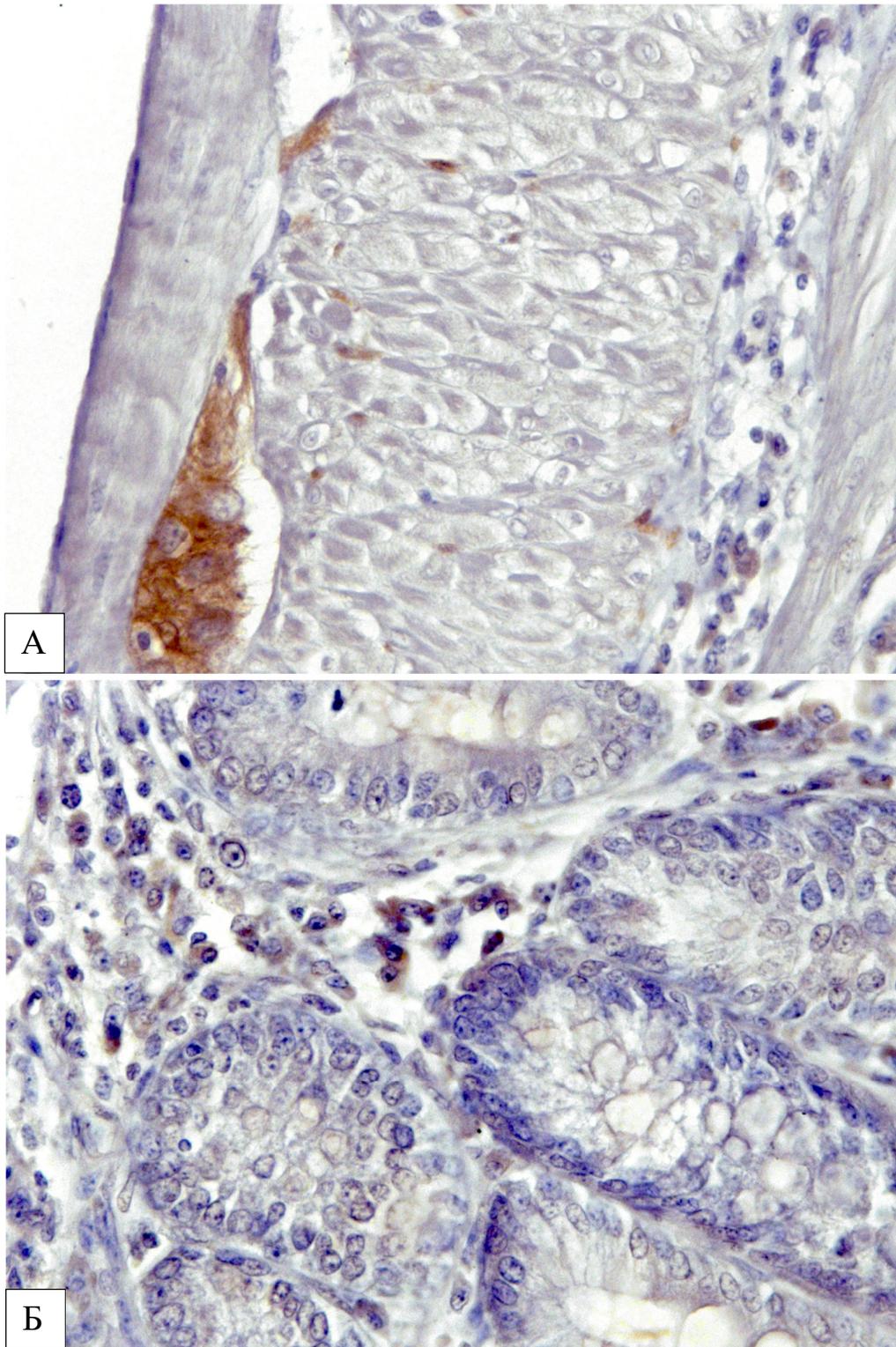


Рис. 72. Хронический колит. Глиальные клетки и их отростки в мышечной оболочке (А) и S100b-позитивные клетки в СПСО (Б) дистального отдела ободочной кишки мыши. ИГХ окрашивание с использованием антител к S100b. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

При хроническом колите относительная площадь, занимаемая нервными волокнами в мышечной оболочке, и их количество возросли (табл. 15, рис. 73 А, Б). Количественные показатели S100b-положительных структур в мышечной оболочке статистически значимо не отличались у животных опытной и контрольной группы (табл. 16).

Морфологическая характеристика маркированного антителами к β III-тубулину и S100b субмукозного сплетения дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При использовании антител к β III-тубулину нервные волокна выявлялись в СПСО. Отдельные нервные волокна и субмукозные ганглии локализовались в подслизистой основе. Нервные волокна располагались в пространстве между криптами и, в зависимости от плоскости среза, были округлые или овальные (рис. 71 Б). Они определялись в язвах, пронизывая их (рис. 74). Показатели количества и относительной площади β III-тубулин-положительных нервных волокон в СПСО не различались между группами (табл. 15).

S100b-положительные клетки и их отростки также были локализованы в СПСО. При хроническом колите их количество и интенсивность окрашивания возросли (табл. 16, рис. 72 Б, 73 В, 75). Наибольшее количество S100b-позитивных клеток располагалось в базальном отделе СПСО в зонах скопления клеток воспалительного инфильтрата.

Таким образом, при ИГХ исследовании ЭНС дистального отдела ободочной кишки у мышей с хроническим колитом не обнаружено качественных отличий от контрольной группы, но выявлялось увеличение площади, занимаемой β III-тубулин-положительными нервными волокнами в мышечной оболочке, и количества S100b-позитивных клеток в СПСО.

Количественные показатели β III-тубулин-положительных нервных волокон в дистальном отделе ободочной кишки у мышей C57Bl/6 при хроническом колите и в контрольной группе, Me (25L;75U)

Оболочки	Параметры	Контрольная группа	Хронический колит	p
Циркулярный слой мышечной оболочки	Относительная площадь, %	2.70 (2.54;2.86)	3.63 (3.12;4.16)	0.01
	Количество на 1000 мкм ²	1.98 (1.94;2.30)	2.56 (2.44;3.09)	0.047
	Минимальный диаметр Фере, мкм	2.71 (2.68;2.73)	2.84 (2.62;2.85)	0.34
СПСО	Относительная площадь, %	1.06 (0.78;1.42)	0.80 (0.46;0.95)	0.46
	Количество на 1000 мкм ²	0.77 (0.68;0.87)	0.65 (0.64;1.17)	0.60
	Минимальный диаметр Фере, мкм	2.44 (2.23;2.64)	2.16 (2.13;2.35)	0.25

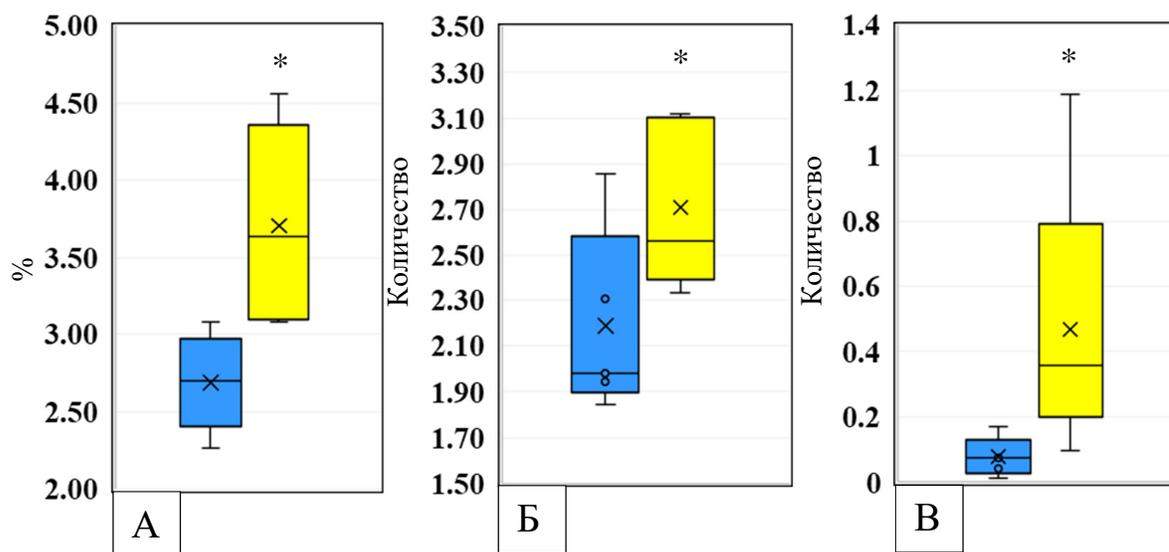


Рис. 73. Относительная площадь (А) и количество (Б) β III-тубулин-положительных волокон на 1000 мкм² в мышечной оболочке и количество S100b-положительных волокон в СПСО (В) дистального отдела ободочной кишки у мышей контрольной группы и при хроническом колите. ■ - контрольная группа, ■ - хронический колит, * - $p < 0.05$

Количественная характеристика S100b-положительных структур в дистальном отделе ободочной кишки у мышей C57Bl/6 у контрольной группы и при хроническом колите, Me (25L;75U)

Оболочки	Параметры	Контрольная группа	Хронический колит	p
Циркулярный слой мышечной оболочки	Относительная площадь, %	0.85 (0.67;0.88)	1.07 (0.80;1.12)	0.25
	Количество на 1000 мкм ²	0.95 (0.81;1.10)	1.30 (1.06;1.53)	0.25
	Минимальный диаметр Фере, мкм	2.28 (2.21;2.31)	2.10 (1.97;2.16)	0.18
СПСО	Количество на 1000 мкм ²	0.08 (0.04;0.09)	0.36 (0.31;0.40)	0.02

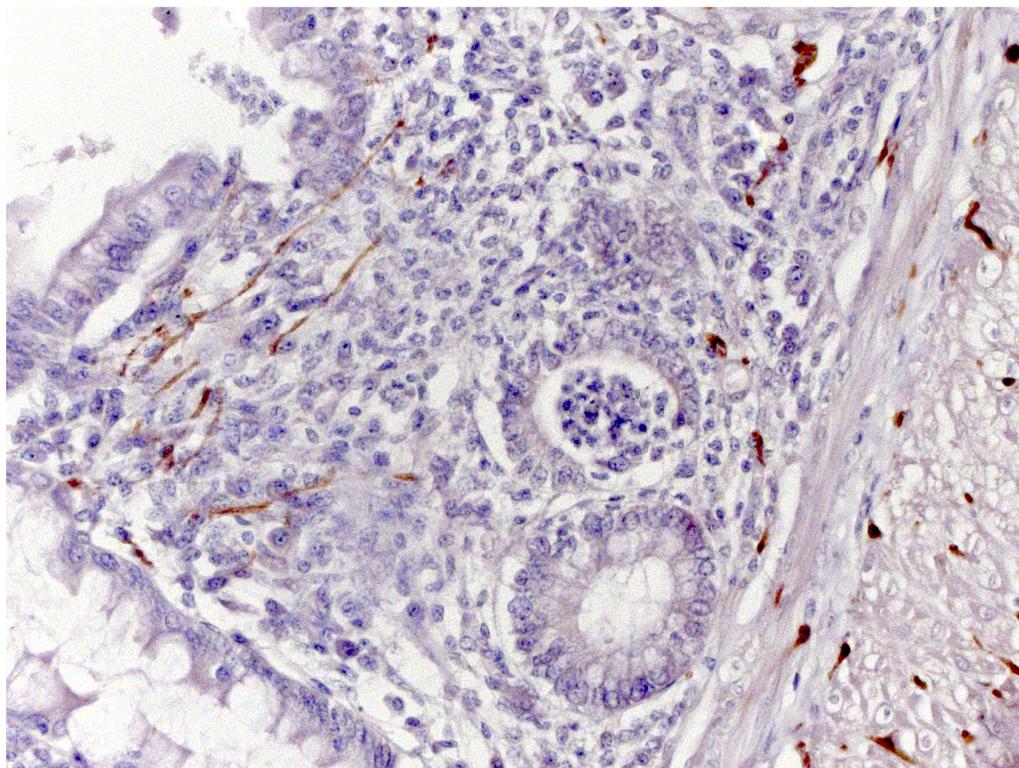


Рис. 74. Хронический колит. Нервные волокна в зоне эпителизированной язвы в дистальном отделе ободочной кишки мыши. Нервные волокна тонкие, располагаются среди клеток воспалительного инфильтрата. ИГХ окрашивание с использованием антител к β III-тубулину. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 400

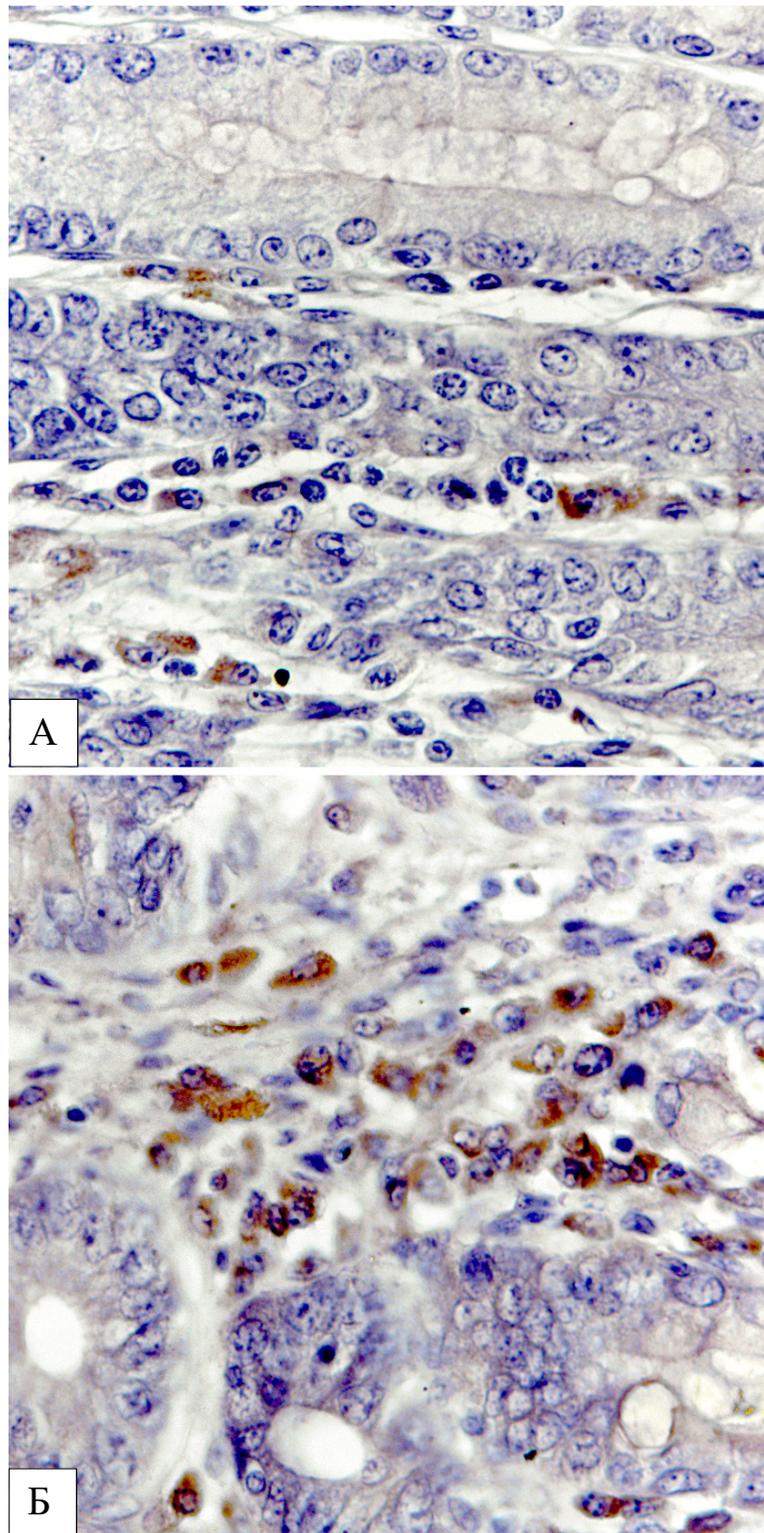


Рис. 75. S100b-позитивные клетки в СПСО дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и с хроническим колитом. При хроническом колите по сравнению с контрольной группой их число увеличено. ИГХ окрашивание с использованием антител к S100b. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. 640

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к HuC/D и S100b миентерального и субмукозного сплетений на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При ИФ исследовании с использованием антител к S100b и HuC/D у мышей с хроническим колитом в миентеральных ганглиях выявлялись тела нейронов, а также глиальные клетки и их отростки (рис. 76 А). Тела нейронов различались по размерам и форме, они были полигональные или вытянутые. В части нейронов определялось округлое ядро с рыхлым хроматином, в области ядра флуоресцентное свечение было менее интенсивным. Глиальные клетки миентеральных ганглиев были представлены телами и волокнистым нейропилем. Они характеризовались интенсивным флуоресцентным свечением тела и ядра и колокализацией в последнем S100b и DAPI, что придавало им циановый оттенок. Глиальные клетки располагались между нейронами и на границе ганглиев, а нейропиле окружал тела нейронов. В циркулярном слое мышечной оболочки выявлялись тела внутримышечных глиальных клеток и их отростки. На качественном уровне различий глиальных клеток и их отростков у животных с хроническим колитом и контрольной группы не было выявлено. Показатели нейрон-глиального отношения не различались при хроническом колите – 2.18 (2.18;2.39) и в контрольной группе – 1.89 (1.74;2.47); $p=0.34$. Субмукозные ганглии при хроническом колите не имели качественных отличий от контрольной группы. Они были единичными на всем протяжении дистального отдела ободочной кишки и, как и миентеральные, состояли из нейронов, тел глиальных клеток и нейропиля (рис. 76 Б).

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к HuC/D и nNOS миентерального и субмукозного сплетений на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При ИФ исследовании с использованием антител к nNOS и HuC/D при хроническом колите в энтеральных ганглиях выявлялись нейроны с колокализацией HuC/D и nNOS, окруженные nNOS-положительными волокнами (рис. 77, 78). В циркулярном слое мышечной оболочки располагались округлые или вытянутые nNOS-положительные нервные волокна. Нитергические нейроны были одиночными или образовывали кластеры из нескольких клеток.

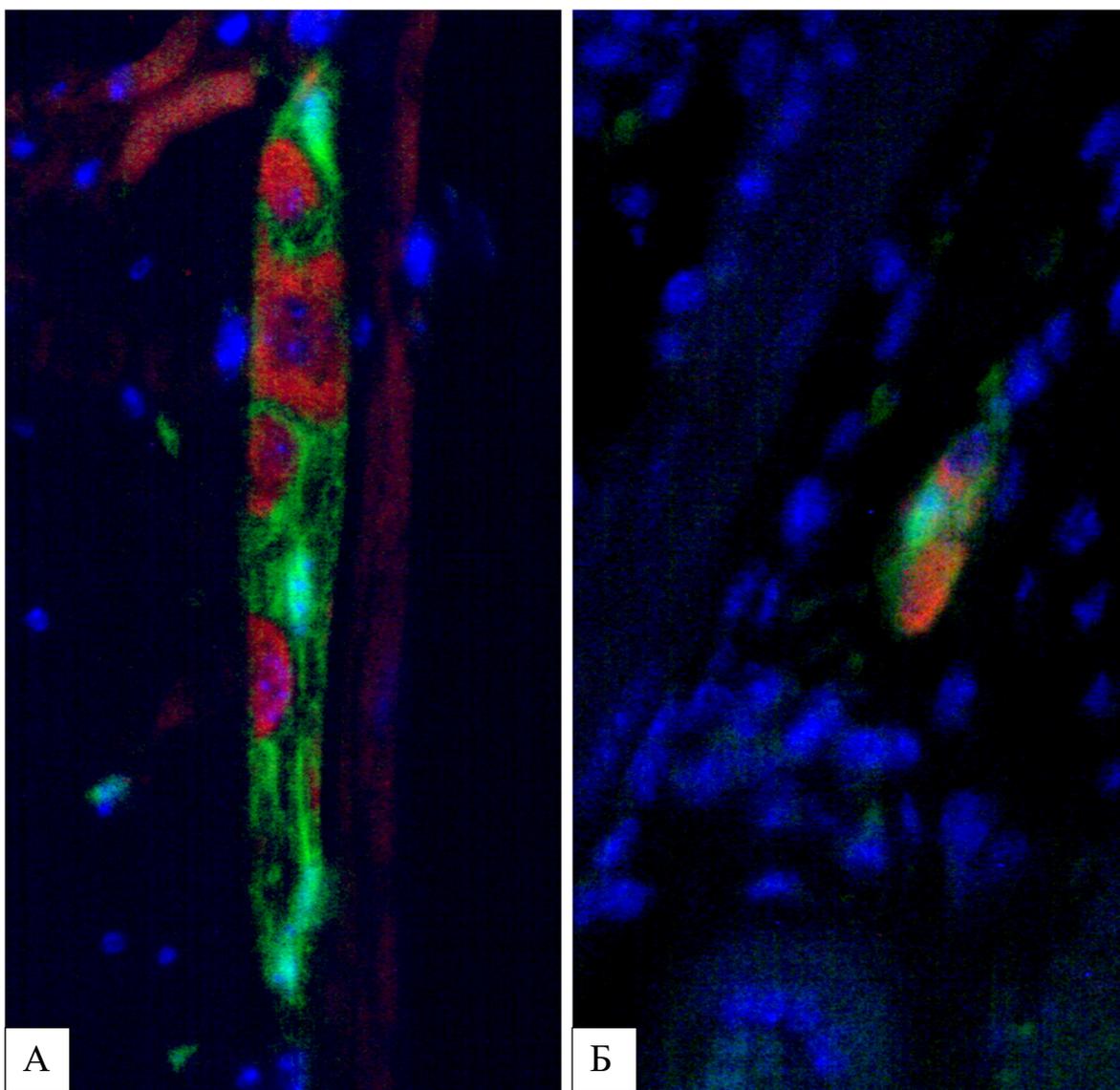


Рис. 76. Хронический колит. Миентеральный (А) и субмукозный (Б) ганглии дистального отдела ободочной кишки мышей, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), S100b и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). Качественных различий по сравнению с контрольной группой не выявлено. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

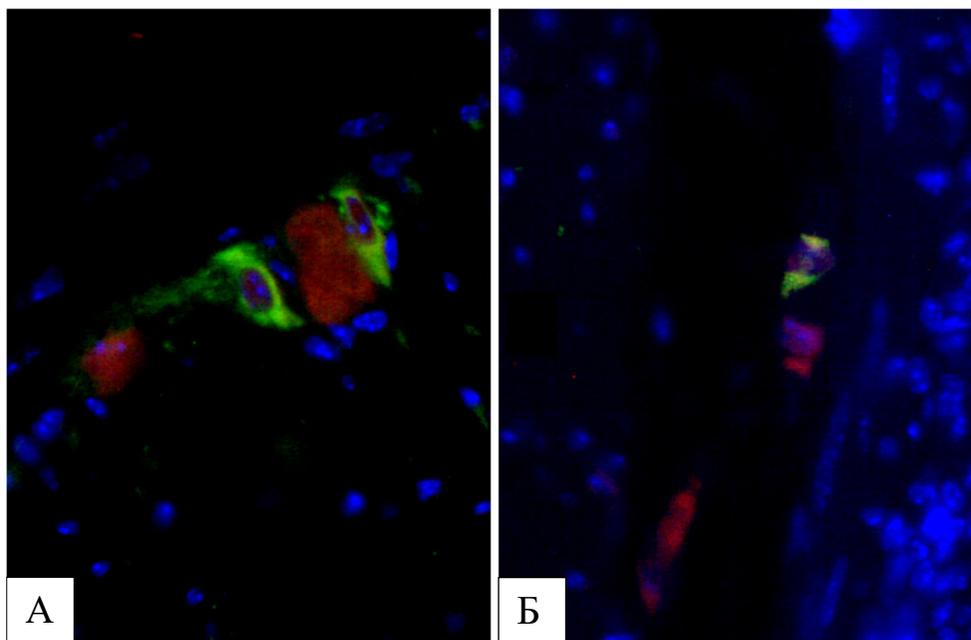


Рис. 77. Хронический колит. Миентеральный(А) и субмукозный (Б) ганглии дистального отдела ободочной кишки мышей, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к маркеру nNOS и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). Нитрергические нейроны располагаются поодиночке или кластерами. Продольные гистологические срезы, флуоресцентная микроскопия. Ув. 400

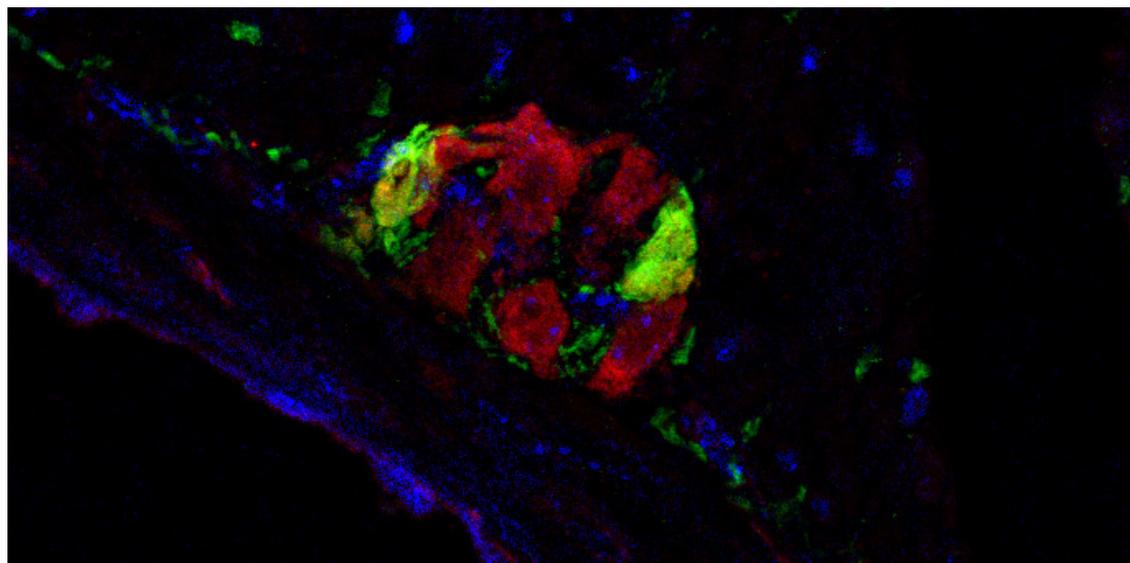


Рис. 78. Хронический колит. Миентеральный ганглий дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированный антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), к маркеру нитрергических нейронов nNOS и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В миентеральном ганглии располагаются два нитрергических нейрона. В нейропиле и окружающей мышечной оболочке выявляются нитрергические нервные волокна. Продольные гистологические срезы, конфокальная микроскопия. Ув. 640

Доля нитрергических нейронов в миентеральных ганглиях не различалась у животных контрольной группы и при хроническом колите, и она составила в контрольной группе 28.93 (27.95;30.83) %, а у животных с хроническим колитом - 29.61 (26.36;30.50) %, $p=0.68$.

Иммунофлуоресцентное исследование миентерального и субмукозного сплетений, маркированных антителами к HuC/D и каспазе-3, на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При ИФ исследовании с использованием антител к каспазе-3 и HuC/D в нейронах миентеральных и субмукозных ганглиев в контрольной группе и при хроническом колите были выявлены рассеянные пылевидные каспаза-3-позитивные гранулы (рис. 79). Они были локализованы в цитоплазме тел нейронов преимущественно перинуклеарно. В большей части нейронов гранулы были единичные или немногочисленные, лишь в отдельных нейронах было умеренное количество каспаза-3-положительных гранул. На качественном уровне различий между мышами контрольной группы и с хроническим колитом при использовании этих маркеров не выявлено.

Иммунофлуоресцентное исследование миентерального и субмукозного сплетений, маркированных антителами к HuC/D и Ki67, на гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При исследовании с использованием маркера клеточной пролиферации Ki67 при хроническом колите, как и в контроле в пределах энтеральных ганглиев пролиферирующие клетки не выявлены.

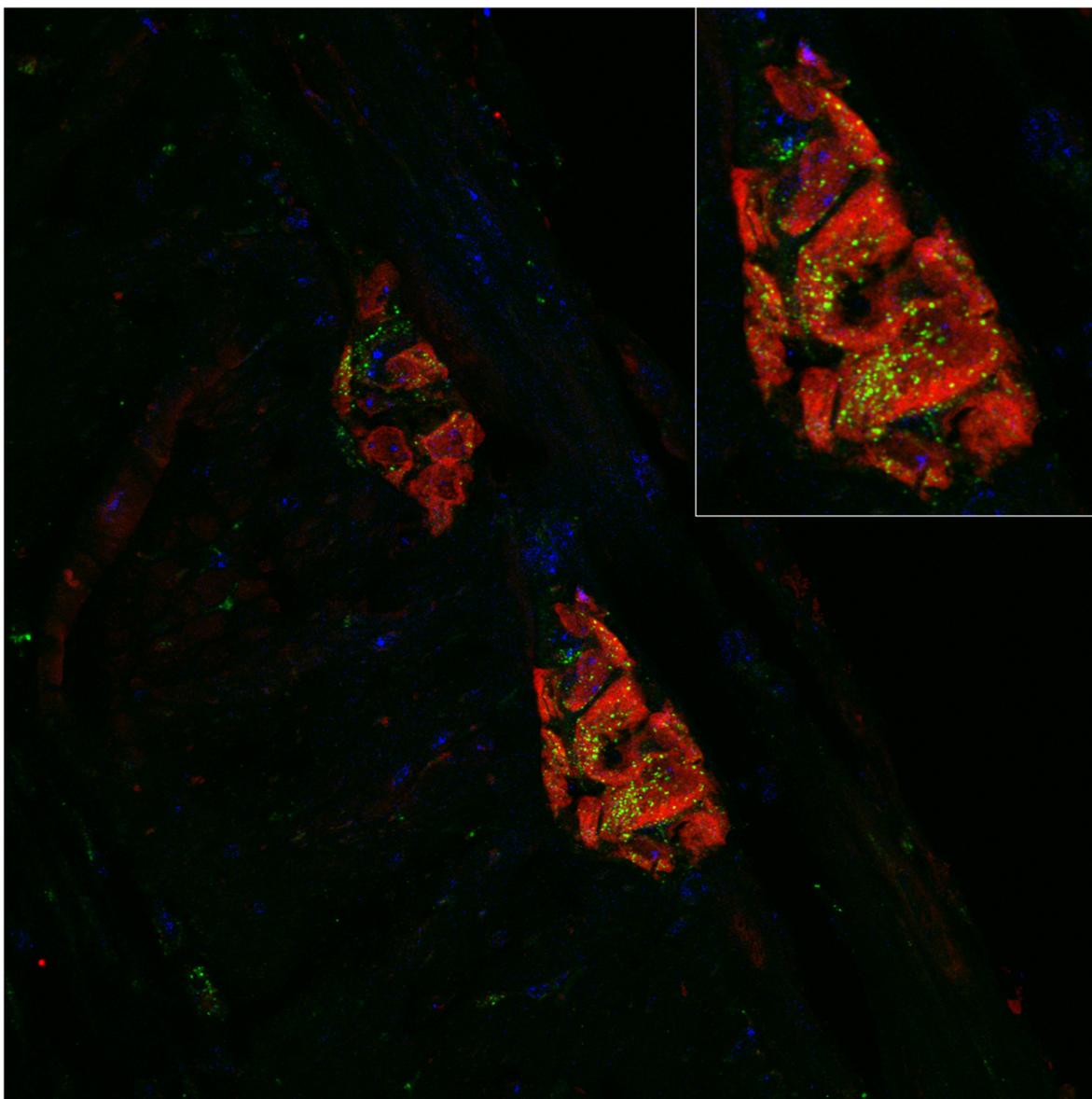


Рис. 79. Хронический колит. Миентеральные ганглии дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), каспазе-3 и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В цитоплазме нейронов немногочисленные гранулы каспазы-3, расположенные преимущественно перинуклеарно. Продольные гистологические срезы, конфокальная микроскопия. Ув. 400

Таким образом, в дистальном отделе ободочной кишки у мышей с хроническим колитом не выявлено изменений нейрон-глиального отношения и относительной доли нитрергических нейронов. Количество гранул каспазы-3 в нейронах было небольшим. В пределах ганглиев Ki67-положительные клетки отсутствовали.

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к HuC/D нейронов миентерального сплетения на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки у самок мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При проведении ИФ маркирования фиксированных в формалине тотальных препаратов у мышей с хроническим колитом было выявлено неравномерность интенсивности свечения с выраженным свечением структур по краям образцов и отсутствием свечения в его толще. Это обусловлено, вероятно, плохой пенетрацией антител на фоне фиброза мышечной оболочки, из-за чего количество исследуемых препаратов было ограниченным. На тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки при маркировании HuC/D у мышей с хроническим колитом (n=3), как и у соответствующих им по возрасту мышей контрольной группы (n=3), миентеральные ганглии имели вид плоскостных полосовидных структур, состоящих из большого числа тел нейронов, располагавшихся в одной плоскости. Встречались небольшие ганглии треугольной или полигональной формы, содержащие от 1 до 6 нейронов (рис. 80 Б). Нейроны различались по размеру и форме. Показатели числа нейронов в поле зрения не различались между группами (табл. 17).

Иммунофлуоресцентное исследование маркированных антителами к S100b глиальных клеток миентерального сплетения на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки у самок мышей C57Bl/6 при хроническом колите

При использовании антител к S100b на тотальных препаратах мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мышей с хроническим колитом и контрольной группы были выявлены внутриганглионарные, межганглионарные и внутримышечные глиальные клетки (рис. 80 Б). В миентеральных ганглиях глиальные клетки и их отростки формировали плотный нейропиль, окружающие нейроны. В циркулярном слое мышечной оболочки глиальные клетки имели вытянутую форму и сопровождали нервные волокна. Глиальные клетки характеризовались высокой интенсивностью свечения и колоколлизацией зеленого и синего флуоресцентного свечения. При хроническом колите было отмечено уменьшение нейрон-глиального отношения (табл. 17).

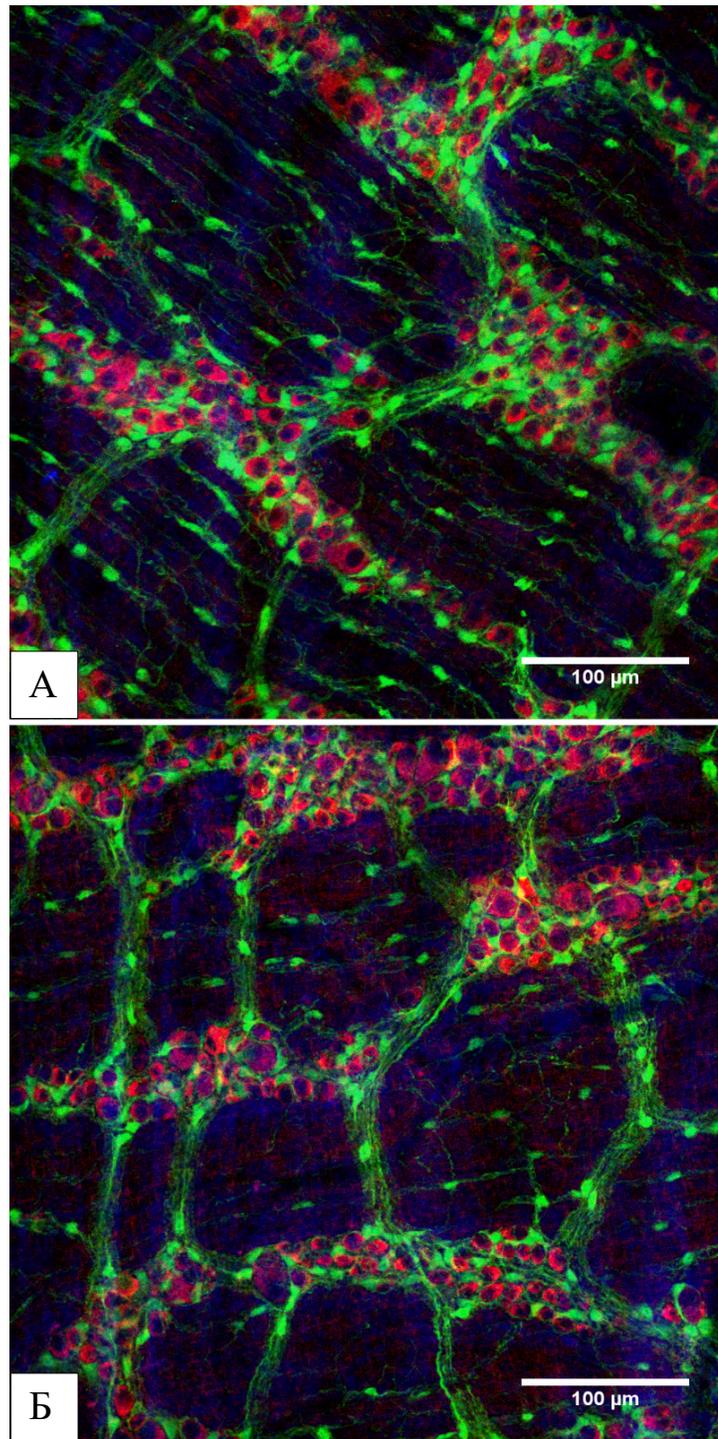


Рис. 80. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки у мыши контрольной группы (А) и при хроническом колите (Б), маркированные антителами к паннейрональному маркеру HuC/D и флуорохромом Alexa Fluor 555 (красное свечение), S100b и FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). В миентеральных ганглиях выявляются нейроны и глиальные клетки, в межганглионарных пространствах локализованы внутримышечные глиальные клетки. На качественном уровне различий между группами нет. Конфокальная микроскопия

Таблица 17

Количественная характеристика HuC/D-положительных нейронов и S100b-положительных глиальных клеток в миентеральном сплетении на тотальных препаратах мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки в контрольной группе и при хроническом колите на площади 0.18 мм². Me (25L;75U)

Параметры	Контрольная группа	Хронический колит	p
Количество нейронов на 0.18 мм ² площади	129.00 (126.00;132.25)	130.00 (124.50;136.63)	0.83
Число глиальных клеток в ганглиях и нервных трактах на 0.18 мм ² площади	121.50 (120.88;125.88)	157.00 (149.00;163.75)	0.13
Нейрон-глиальный индекс	1.02 (1.01;1.03)	0.85 (0.84;0.85)	0.0495
Количество внутримышечных глиальных клеток на 0.18 мм ² площади	31.00 (29.38;35.50)	32.50 (30.25;34.25)	0.83

Гистоархитектоника маркированного антителами к β III-тубулину миентерального сплетения на тотальных препаратах дистального отдела ободочной кишки при хроническом колите у самцов мышей C57Bl/6

ИФ исследование тотальных препаратов дистального отдела ободочной кишки было проведено у мышей с хроническим колитом (n=4). Для выявления нейронов и их отростков применяли антитела к паннейрональному маркеру β III-тубулину.

Миентеральные ганглии у мышей обеих групп не имели четкой границы и были образованы телами нейронов и их отростками, которые формировали нервные тракты, находящиеся между ганглиями и в них (рис. 81 А). В циркулярном слое мышечной оболочки нервные волокна располагались параллельно циркулярному слою мышечной оболочки (рис. 81 Б). На качественном уровне и при количественной оценке не выявлено различий между мышцами с хроническим колитом и контрольной группы (табл. 18).

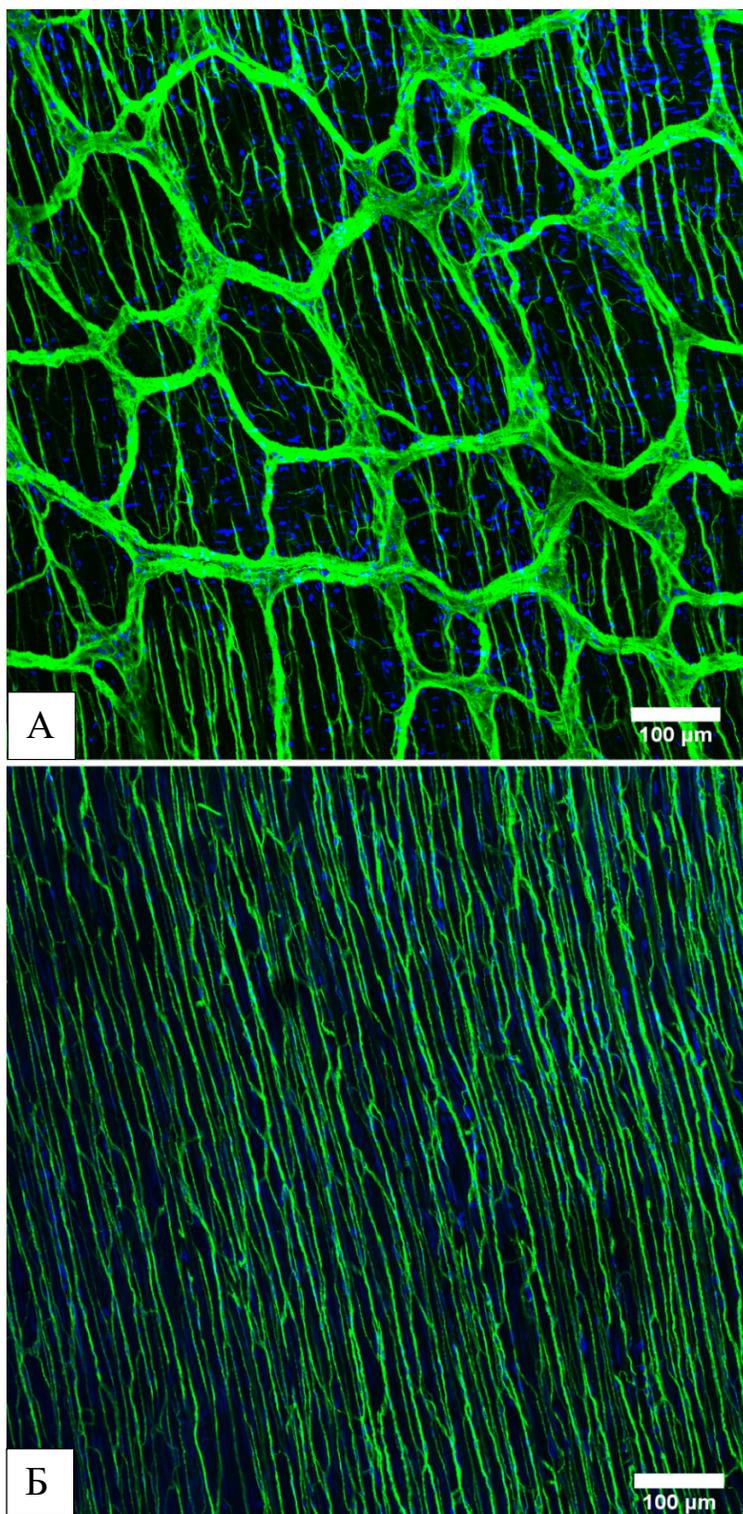


Рис. 81. Хронический колит. Тотальные препараты мышечной оболочки дистального отдела ободочной кишки мыши, маркированные антителами к паннейрональному маркеру β III-тубулину и флуорохромом FITC (зеленое свечение) и DAPI (синее свечение). А – сеть миентеральных ганглиев и нервных трактов средней плотности, нервные тракты слабо извитые; Б – внутримышечные нервные волокна, расположенные по ходу гладких миоцитов. Конфокальная микроскопия.

Количественная характеристика маркированных антителами к β III-тубулину нейронов и нервных волокон в миентеральных ганглиях и циркулярном слое мышечной оболочки на тотальных препаратах в контрольной группе и при хроническом колите, Me (25L;75U)

Параметры	Контрольная группа	Хронический колит	p
Миентеральные ганглии и нервные тракты			
Относительная площадь, %	34.55 (32.06;36.97)	34.05 (32.79;35.35)	1.0
Отношение площади к периметру	23.47 (21.79;25.41)	24.89 (23.15;25.35)	0.77
Средняя толщина, мкм	39.28 (36.25;41.02)	37.75 (33.05;40.71)	0.77
Средняя толщина нервных трактов, мкм	18.52 (17.59;19.19)	18.40 (16.63;19.75)	1.0
Внутримышечные нервные волокна			
Относительная площадь, %	15.15(12.80;18.24)	17.48 (16.58;18.75)	0.56
Отношение площади к периметру	6.75 (6.21;7.21)	6.83 (5.95;7.64)	1.0
Средняя толщина, мкм	3.52 (3.07;4.00)	4.06 (3.83;4.30)	0.24

Таким образом, при ДСН-индуцированном хроническом колите клинические проявления у самцов мышей C57Bl/6 были минимальны и характеризовались уменьшением времени транзита красителя через ЖКТ. В проксимальном отделе ободочной кишки количество миентеральных ганглиев снизилось на 30%. Структурно-функциональные изменения нейронов при хроническом колите были менее выражены чем при остром: размеры миентеральных нейронов в медиальном отделе уменьшились на 16%, а их ядер на 6%, доля гиперхромных нейронов в дистальном отделе возросла в 3.3 раза. В тоже время в циркулярном слое мышечной оболочки на 34% увеличилась площадь β III-тубулин-положительных волокон, и на 29% их количество. В СПСО при хроническом колите в 4.5 раза возросло число S100b-положительных клеток.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение изменений ЭНС при ВЗК является актуальной проблемой современной нейрогастроэнтерологии, и в последние годы большое количество работ посвящено исследованию роли ЭНС в патогенезе язвенного колита и болезни Крона у человека и на экспериментальных моделях ВЗК (Cirillo C. et al., 2011). Важная роль ЭНС для функционирования ЖКТ в норме и при ВЗК обусловлена тем, что она представлена на всем протяжении ЖКТ и регулирует абсорбционную, секреторную и барьерную функцию его органов (Gulbransen B., Brown I., 2014; Furness J., 2006, 2008, 2012). Несмотря на более 150-летнюю историю изучения ЭНС, она остается одной из наименее изученных отделов нервной системы. Это во многом обусловлено ее сложной трехмерной гистоархитектоникой, тесной взаимосвязью с окружающими ее тканями, морфофункциональными отличиями составляющих ее клеток от клеток других отделов периферической нервной системы. Недостаточная изученность морфологии ЭНС в норме как у человека, так и лабораторных животных затрудняет оценку и интерпретацию выявляемых в ней изменений при патологии.

Для изучения ЭНС необходимо применение комплекса классических и современных морфологических методов, позволяющих охарактеризовать как структуру ганглиев, так и сеть нервных волокон. В нашем исследовании использованы рутинные гистологические методы окрашивания, которые выявляют в ганглиях тела нейронов и ядра глиальных клеток, но не позволяют визуализировать нейропиль и отростки нейронов. При окрашивании по методу Ниссля можно относительно селективно выявить тела нейронов и оценить их тинкториальные свойства, которые отражают различное функциональное состояние этих клеток (Жаботинский Ю.М., 1965; Ермохин П.Н., 1969). Для выявления отростков нейронов и глиальных клеток, а также их различных типов, могут быть использованы такие методы как серебрение, ИГХ, ИФ и трансгенные методы. Метод серебрения широко применяли на ранних этапах развития нейроморфологии такие нейрогистологи как Рамон-и-Кахаль, Гольджи и другие (Kandel E. et al., 2013). Однако, он редко используется в современных морфологических исследованиях (Highley J., Sullivan N., 2013). Гистохимические методы изучения ЭНС также заменяются иными методами. Перспективным методом исследования ЭНС является применение генно-инженерного маркирования структур ЭНС, в частности, GFP меткой (Green Fluorescent Protein – зеленый флуоресцентный белок) или другими флуоресцентными протеинами (Gombash Lampe S. et al., 2014; Jiang Y. et al., 2017). Однако эти методы требуют специального оснащения лаборатории и подготовки животных, достаточно дороги, и пока они не получили широкого распространения. В настоящее время подавляющее большинство работ по морфологическому исследованию ЭНС проводятся с использованием ИГХ или ИФ на гистологических срезах и

тотальных препаратах. Гистологические срезы потенциально позволяют исследовать всю длину ободочной кишки и проводить оценку морфологических изменений ЭНС при патологии. Однако для выявления трехмерной структуры ЭНС на гистологических препаратах необходимо изготовление серийных срезов, что требует большого количества времени и реактивов для окрашивания. Применение тотальных препаратов в сочетании с методом конфокальной микроскопии позволяет наиболее полно охарактеризовать трехмерную структуру ЭНС. Главным ограничением в работе с тотальными препаратами является их небольшой размер, обычно не превышающий нескольких миллиметров, и медленное и часто неполное пенетрирование антител в глубину тканей стенки кишки.

Применение ИГХ и ИФ методов позволяет оценить с высокой достоверностью структурные изменения ЭНС, однако большинство волокон ЭНС состоит из более чем одного аксона и глиальной клетки, и их повреждения могут быть далеко не очевидными даже при самом большом оптическом увеличении. Для этой цели требуется использование трансмиссионной электронной микроскопии. Она позволяет с высокой точностью выявить альтеративные изменения нейронов и глиальных клеток, но малая площадь исследуемых зон во многом ограничивает возможности этого метода.

В отличие от предыдущих исследований, в нашей работе при исследовании ЭНС в норме и при экспериментальном колите мы впервые применили комплекс гистологических, иммуногистохимических, иммунофлуоресцентных и электронномикроскопических методов в сочетании с оценкой функционального состояния толстой кишки.

По данным нашего исследования в толстой кишке у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы ЭНС представлена ганглиями и нервными отростками, количество миентеральных ганглиев не различается между отделами ободочной кишки, а субмукозных ганглиев в дистальном отделе ободочной кишки меньше чем в проксимальном. Это связано с различиями в функции указанных отделов ободочной кишки, так известно, что в дистальном отделе ободочной кишки процессы абсорбции выражены в меньшей степени чем в проксимальном (Beck D. et al., 2011). В составе ганглиев при окрашивании по методу Ниссля нами выявлены нейроны различной хромности и глиальные клетки. Количество нейронов на ганглий в ободочной кишке в ее разных отделах у мышей не различается, что согласуется с данными A. Araújo et al. (2003), полученными при исследовании ЭНС у крыс. Большинство миентеральных нейронов у мышей являются нормо- или гипохромными, а гиперхромные или пикнотические нейроны представлены в небольшом количестве. В литературе отсутствуют работы, в которых бы исследовались энтеральные нейроны ободочной кишки мыши при окрашивании по методу Ниссля. Гипохромность нейронов ЦНС у человека и животных может

быть признаком альтеративных изменений, изменения синтетической функции или же нормального функционирования нейрона и проявляется в виде центрального или тотального хроматолиза (Жаботинский Ю.М., 1965; Ермохин П.Н., 1969). Очевидно, из-за преимущественно небольшого, хотя и вариабельного размера цитоплазмы нейронов у мыши многие изменения субстанции Ниссля, выявляемые у человека и крупных животных, не определяются. В связи с этим в нашей работе было обращено внимание на хромность цитоплазмы и ядра, а также размер клетки. Выявленная нами вариабельность базофилии и размеров нейронов ЭНС в норме обусловлена их морфофункциональной гетерогенностью, описанной и другими авторами и связанной с большим количеством функциональных типов нейронов ЭНС (Фоканова О.А., Румянцева Т.А., 2006; Furness J., 2006).

При ИГХ и ИФ исследовании у самцов мышей C57Bl/6 нервные отростки представлены во всех оболочках ободочной кишки, достигая максимального количества в циркулярном слое мышечной оболочки. Миентеральное сплетение у мыши является более массивным чем субмукозное, его ганглии и нервные тракты по данным нашего исследования занимают на тотальных препаратах 25% площади мышечной оболочки, а нервные отростки на гистологических срезах - 3.2%. По нашим данным на тотальных препаратах у мышей контрольной группы количество миентеральных нейронов составляет 742 клетки на мм². Эти результаты совпадают с полученными другими исследователями. P. Gamage et al. (2013) указывают, что число нейронов у мышей составляет в среднем 618 клеток на мм². На тотальных препаратах размеры и форма отдельных ганглиев вариабельны, а сами ганглии не всегда имеют четкие границы, образуя полосовидную сеть, в связи с чем подсчет нейронов на ганглий нецелесообразен. Нервные волокна у мышей C57Bl/6 занимают в циркулярном слое мышечной оболочки 3.6%, а в СПСО - 1.2%. Наши результаты исследования плотности иннервации стенки ободочной кишки сопоставимы с данными других исследователей. Так, по данным M. Blennerhassett et al. (2017) нервные волокна занимают около 5% площади циркулярного слоя мышечной оболочки у мышей BALB/c. Эти различия связаны с особенностями линий животных, ориентации гистологических срезов и используемых антител для маркирования нервных волокон. В нашем исследовании продольный слой мышечной оболочки и серозная оболочка ободочной кишки мыши слабо иннервированы из-за их небольшой толщины, что, вероятно, является видовой особенностью мышей. Используемые нами маркеры не позволяют отличить нервные отростки ЭНС от симпатических, парасимпатических и афферентных, которые, тем не менее, тесно связаны с ЭНС (Furness J., 2012).

Таким образом, богатая иннервация кишки у мышей C57Bl/6 и большое количество нейронов в миентеральном сплетении могут быть потенциально избыточными для поддержания нормальной функции кишки, что важно в процессах нейропластичности при воспалительных заболеваниях кишечника и возрастной нейродегенерации.

По нашим данным около 27% всех миентеральных нейронов ободочной кишки у мышей C57Bl/6 являются нитрергическими. P. Gamage et al. (2013) показали, что доля нитрергических нейронов при исследовании тотальных препаратов у мыши достигает 42%. Несоответствие этих данных нашим результатам может быть связано с тем, что мы подсчитывали нитрергические нейроны на продольных гистологических срезах, на которых они с меньшей вероятностью попадали в плоскость среза. В нейронах ЭНС у мышей C57Bl/6 содержится небольшое количество гранул, иммунореактивных по маркеру апоптоза каспазе-3. В нейронах каспаза-3 играет важную роль не только в процессах клеточной смерти, но и нормального функционирования клетки (Яковлев А.А., 2004; D'Amelio M. et al., 2010), в связи с чем небольшое количество гранул каспазы-3 в них не является признаком их гибели путем апоптоза.

Применение нами комплекса гистологических, ИГХ и ИФ методов позволило детально охарактеризовать энтеральную глию. К сожалению, не существует универсальных пан-глиальных маркеров, и для надежного ИГХ или ИФ выявления глиии предпочтительным является сочетание нескольких маркеров (Gulbransen B. et al., 2012, 2014; Grubišić V., Gulbransen B., 2017). Помимо подсчета на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, позволяющего выявить внутриганглионарную глию, мы использовали маркер S100b, так как он экспрессируется в 90% энтеральных глиальных клеток и позволяет выявить как их тела, так и отростки (Gulbransen B., Brown I., 2014; Grubišić V., Gulbransen B., 2017). На гистологических срезах, маркированных глиальным маркером S100b, количество глиальных клеток у самцов мышей C57Bl/6 было большим чем на срезах, окрашенных по методу Ниссля, так как этот метод маркирования позволяет выявить глиальные клетки вне ганглиев.

На тотальных препаратах, по сравнению с продольными срезами, у самцов мышей C57Bl/6 выявляется наибольшее число глиальных клеток. Нейрон-глиальное отношение в среднем составило 1, что согласуется с данными литературы (Grubišić V., Gulbransen B., 2017). Количество глиальных клеток зависит от отдела ободочной кишки – их больше в проксимальном отделе чем в дистальном. Региональные особенности численности глиальных клеток ЭНС в литературе не описаны. Глиальные клетки ЭНС выполняют многочисленные функции, такие как трофические, нейропротекторные и нейромодулирующие, они необходимы для поддержания эпителиального барьера и локального иммунного гомеостаза

(Gershon M., 2011; Gulbransen B., Brown I., 2014). Меньшее число глиальных клеток в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным у самцов C57Bl/6 обусловлено, по-видимому, региональными различиями ее функции.

Второй важной морфологической особенностью ЭНС является ее обособленность от окружающих тканей капсулой, которая прослеживается как на гистологических срезах при окрашивании гематоксилином и эозином и по Нисслю, так и при окрашивании на соединительную ткань пикросириусом красным. При ультраструктурном исследовании ганглии и нервные волокна обоих сплетений окружены коллагеновыми фибриллами и частично отростками глиальных клеток. В нейропиле межклеточные пространства не выражены, и в нем нет коллагеновых волокон, что подтверждается и другими исследователями (Gabella G., 1982; Natali M. et al., 2000). Наличие гематоганглионарного барьера, аналогичного гематоэнцефалическому барьеру ЦНС, является предметом дискуссий. Рядом авторов предполагает его существование (Gershon M., Bursztajn S., 1978; Spiller R., 2004; Wood J., 2011), другие это отрицают (Furness J., 2006) или указывают на его частичную проницаемость (Allen D., Kiernan J., 1994). В пределах ганглия мы выявили только нейроны и глиальные клетки и их отростки. Это может быть связано с отсутствием в них кровеносных и лимфатических сосудов, коллагена и выраженных межклеточных пространств в нейропиле, что затрудняет миграцию клеток. Нервные волокна по своему строению не отличаются от нейропиля ганглиев и состоят из аксонов нейронов и глиальных клеток и, соответственно, окружены коллагеновыми фибриллами.

В нашем исследовании мы исследовали морфологические изменения ЭНС на модели тяжелого острого колита, который в целом соответствует тяжелому ЯК у человека в стадии обострения или фульминантному колиту. У животных с острым ДСН-индуцированным колитом нарушение функции ЖКТ характеризовалось диарей с кровью, в кале увеличилась относительная доля жидкости, а длина ободочной кишки уменьшалась на 40%. Несмотря на диарею, при остром колите время транзита красителей – синего Эванса и кармина красного, через ЖКТ не изменилось. Это может быть связано со стазом кишечного содержимого, описанном у больных с ЯК при обострении заболевания (Bassotti G. et al., 2014)

При остром колите макроскопически ободочная кишка уменьшилась в длину, микроскопически выявлялся выраженный острый воспалительный процесс в слизистой оболочке, однако, нами не было выявлено увеличения толщины мышечной оболочки или ее значительной воспалительной инфильтрации. Это связано с тем, что при ДСН-индуцированном колите в воспалительный процесс вовлекается преимущественно слизистая оболочка, а мышечная вовлечена в меньшей степени (Blennerhassett M. et al., 2017).

В нашем исследовании на гистологических срезах ободочной кишки, окрашенных по методу Ниссля, мы выявили увеличение числа миентеральных ганглиев, их количество возросло во всех отделах ободочной кишки. Увеличение числа ганглиев на качественном уровне наблюдалось также и при ИГХ и ИФ маркировании гистологических срезов и на тотальных препаратах. На фиксированных в ацетоне и маркированных β III-тубулином тотальных препаратах выявлено умеренное разрежение миентерального сплетения без увеличения его общей площади. У мышей с острым колитом в отличие от контрольной группы нервные тракты были волнообразные и истонченные. В литературе не описаны изменения числа миентеральных ганглиев при ЯК и БК, а также на модели ДСН-индуцированного колита. При ТНБС-индуцированном колите, который является моделью болезни Крона и характеризуется трансмуральным воспалением, количество миентеральных ганглиев не изменяется (Sanovic S. et al., 1999) или отмечается уменьшение их числа (Lin A. et al., 2005). На этой модели выявлено как уменьшение количества ганглиев и площади миентерального сплетения (Kinoshita K. et al., 2007), так и отсутствие изменений (Boyer L. et al., 2005) или восстановление миентерального сплетения в отдаленный период после индукции колита (Poli E. et al., 2001). Очевидно, увеличение числа ганглиев не связано с пролиферацией нейронов или глиальных клеток, так как у самцов мышей C57Bl/6 в энтеральных ганглиях не обнаружено митозов или Ki67-положительных клеток, хотя в литературе имеются данные о нейрогенезе при ДСН-индуцированном колите (Belkind-Gerson J. et al., 2015).

Таким образом, значительное увеличение количества миентеральных ганглиев при остром колите обусловлено, в первую очередь, сокращением длины кишки и сопряженной с этим компактизацией миентерального сплетения.

При исследовании тотальных препаратов, маркированных β III-тубулином, по сравнению с контрольной группой при остром колите нервные тракты становятся в большей степени извитыми, что также может быть следствием изменения длины кишки. «Штопорообразность» нервных волокон обнаружена при экспериментальном перитоните у кошек (Пестерева М.Л., 1999). В нашем эксперименте различия между тотальными препаратами, фиксированными ацетоном и формальдегидом, связаны, очевидно, с различным эффектом этих фиксаторов на гистоархитектонику ободочной кишки (Роскин Г.И., 1957). При остром колите у самцов мышей C57Bl/6 изменения количества субмукозных ганглиев из-за их небольшого числа удалось оценить только в проксимальном отделе, в котором их число возрастает. В других отделах ободочной кишки субмукозные ганглии единичны как в контрольной группе, так и при остром колите.

Мы не выявили воспалительных клеток в ганглиях при остром колите. Однако в литературе описывается нейтрофильная (Lakhan J., Kirchgessner A., 2010), лимфоцитарная (Racalbuto A. et al., 2008) или эозинофильная инфильтрация (Schäppi M. et al., 2003) энтеральных ганглиев при ВЗК и при ганглионевритах у человека. При ТНБС-индуцированном илеите около миентеральных и субмукозных ганглиев обнаруживаются эозинофилы и Т-лимфоциты (Pontell L. et al., 2009). На нашей модели ДСН-индуцированного колита у самцов мышей C57Bl/6 показано, что субмукозные ганглии окружены большим количеством клеток воспалительного инфильтрата, но эти клетки не проникают в них. Таким образом, признаки ганглионеврита при остром ДСН-индуцированном колите отсутствуют.

В нашем исследовании увеличение количества миентеральных ганглиев на единицу длины кишки сочетается с повышением числа миентеральных нейронов. Для более точной оценки числа нейронов исследованы тотальные препараты, маркированные NuC/D, что позволяет подсчитывать все нейроны миентерального сплетения, тогда как на срезах, окрашенных по методу Ниссля или ИФ, можно количественно оценить лишь нейроны, попадающие в плоскость среза. На тотальных препаратах количество нейронов на единицу площади кишки увеличилось, что подтверждает результаты, полученные на гистологических срезах. Литературные данные об изменении числа нейронов у человека и при экспериментальном колите противоречивы. В миентеральном сплетении у человека описывается гипертрофия и гиперплазия нейронов, более выраженные при болезни Крона (Bishop A. et al., 1980; Belai A. et al., 1997; Strobach R. et al., 1990; Villanacci V. et al., 2008). При ЯК у человека также описано уменьшение как NuC/D-позитивных нейронов, так и S100b-положительных глиальных клеток (Bernardini N. et al., 2012). Однако оценка числа нейронов у человека затруднена из-за методических сложностей. В большинстве экспериментальных исследований, в которых для индукции колита используется ТНБС или ДНБС, а в качестве животных крысы, реже морские свинки или мыши, отмечено уменьшение числа нейронов (Sarnelli G. et al. 2009; Kinoshita K. et al., 2007; Poli E. et al., 2001; Sanovic S. et al., 1999; Linden D. et al., 2005, 2012; Boyer L. et al., 2005; Ippolito C. et al., 2014; Robinson A. et al., 2014; da Silva M. et al., 2015; Stavely R. et al., 2015). На модели ДСН-индуцированного колита показано уменьшение количества миентеральных нейронов (Gulbransen B. et al., 2012; Moynes D. et al., 2014), отсутствие изменений (Mizuta Y. et al., 2000; Winston J. et al., 2013, Blennerhassett M. et al., 2017) или повышение их числа (Belkind-Gerson J. et al., 2015). Противоречивость этих данных, обусловлена, вероятно, несколькими причинами. Эксперименты различаются по веществам, используемым для индукции колита, их дозировке, срокам выведения из эксперимента, виду, линии и полу животных, протоколам фиксации, окрашивания и

морфометрического анализа тканей. Различные виды и линии животных отличаются по степени выраженности колита (Абдулаева С.О., 2012) и изменениям ЭНС при ДСН-индуцированном колите (Blennerhassett M. et al., 2017), на тяжесть колита также влияет пол животного (Гао Ю., 2016). Показано, что острое воспаление ободочной кишки, как ТНБС/ДНБС- так и ДСН-индуцированное, может вызывать изменения иммунореактивности нейронов по ряду маркеров, из-за чего результаты исследования ЭНС с применением разных маркеров могут различаться (Boyer L. et al., 2005; Winston J. et al., 2013). Выраженность иммунореактивности нейронов может зависеть от их функционального состояния. Так, показано, что после разрешения острого воспалительного процесса экспрессия нейрональных маркеров в нейронах ЭНС восстанавливается (Poli E. et al., 2001). В нашей работе для оценки гистоархитектоники миентерального сплетения мы применяли антитела к β III-тубулину, а для подсчета нейронов - к NuC/D. β III-тубулин - паннейрональный маркер, выявляемый в телах и отростках нейронов (Tanapat P., 2013), и на нашем материале не обнаружено значительной вариабельности интенсивности иммунореактивности. Следовательно, при применении β III-тубулина в равной степени выявляются нейроны с различным функциональным состоянием, которые при использовании других маркеров могут не выявляться. NuC/D по нашим данным локализован в энтеральных нейронах, причем вариабельность его ИФ иммунореактивности в разных нейронах сравнительно небольшая. Использованный нами комплекс методов позволил с высокой надежностью выявить большинство ганглиев и нейронов, их образующих, независимо от их функционального состояния.

Уменьшение числа нейронов, описанное в других исследованиях, может быть связано с их гибелью или изменением гистоархитектоники миентерального сплетения, в частности его разрежением, а увеличение их количества, показанное в нашей работе и исследовании J. Belkind-Gerson et al. (2015), может быть обусловлено процессами нейрогенеза или, что более вероятно, компактизацией миентерального сплетения. Для выявления апоптоза нейронов нами использованы антитела к каспазе-3, а в качестве маркера пролиферации – Ki67. Хотя гранулы каспазы-3 могут содержаться в нейронах и в норме (D'Amelio M. et al., 2010), нами было отмечено значительное увеличение их числа в миентеральных нейронах при остром колите, при этом отдельные нейроны были заполнены гранулами полностью, что не встречалось у животных контрольной группы. Несмотря на это, интенсивность свечения таких нейронов была ниже чем гибнущих путем апоптоза колоноцитов в поверхностных отделах эпителия животных контрольной группы. Основная масса нейронов при остром колите характеризовалась небольшим или умеренным числом гранул каспазы-3. Апоптоз нейронов описан при ТНБС (Boyer L. et al., 2005; Gulbransen B. et al., 2012) и ДСН-индуцированном

колите (Gulbransen B. et al., 2012). В одном из исследований на модели ТНБС-индуцированного колита у крыс не выявлено различий в выраженности апоптоза миентеральных нейронов при остром колите по сравнению с контрольной группой (Sigalet D. et al., 2010). В нашем исследовании гибель нейронов при остром колите ограничена и она, очевидно, оказывает слабое влияние на численные показатели миентеральных нейронов.

Мы не выявили митозов или Ki67-положительных клеток в пределах миентеральных и субмукозных ганглиев, и таким образом, в отличие от Belkind-Gerson J. et al (2015), нами не получено свидетельств о нейрогенезе как основной причине повышения числа энтеральных нейронов при ДСН-индуцированном колите. Таким образом, увеличение числа нейронов в нашей работе связано с компактизацией миентерального сплетения. Так как миентеральные ганглии у мышей расположены в виде лент, идущих параллельно, сокращение сети во фронтальном направлении при уменьшении длины кишки из-за сокращения гладких миоцитов приводит не только к увеличению количества миентеральных ганглиев на гистологических срезах, но и к повышению числа нейронов на единицу площади кишки на тотальных препаратах из-за продольного «сжатия» ганглиев.

Из-за небольшого количества субмукозных ганглиев и их сравнительно малого размера в ободочной кишке у мышей C57Bl/6 мы не проводили морфометрическую оценку нейронов в них. На качественном уровне состав субмукозных ганглиев при остром колите не отличался от такового в контрольной группе. Интенсивность свечения каспазы-3 в субмукозных нейронах при остром колите была сходной с таковой в миентеральных нейронах. В литературе изменения субмукозных ганглиев и нейронов описаны только на моделях ТНБС/ДНБС-индуцированного колита, и показано уменьшение числа субмукозных ганглиев без снижения количества нейронов (Sanovic S. et al., 1999) или с уменьшением их числа на ганглий (Sigalet D. et al., 2010; Da Silva M. et al., 2017). На модели ДСН-индуцированного колита субмукозные ганглии не охарактеризованы. В нашем исследовании на качественном уровне каких-либо изменений субмукозных ганглиев при остром колите не обнаружено.

Функциональное состояние ЭНС во многом определяется не только общим количеством нейронов, но и соотношением их различных популяций. При остром колите на гистологических срезах, окрашенных по методу Ниссля, выявлено снижение относительной доли гипохромных нейронов в миентеральных ганглиях, а в дистальном отделе ободочной кишки уменьшение размеров цитоплазмы нейронов. В литературе отсутствуют данные об изменениях тинкториальных свойств энтеральных нейронов у животных и человека при окрашивании по методу Ниссля при экспериментальном колите.

Изменения базофилии цитоплазмы нейронов ЦНС и ЭНС ряд авторов связывает с изменением их функционального состояния, в том числе синтетической функции (Жаботинский Ю.М., 1965; Ермохин П.Н., 1969; Орехова Е. В., 1990). В нашем исследовании уменьшение числа гипохромных нейронов может косвенно свидетельствовать об изменении синтетической активности миентеральных нейронов. Тинкториальные свойства нейронов лабильны и зависят от их функционального состояния (Жаботинский Ю.М., 1965). Размер нейронов также может изменяться у животных с острым колитом по сравнению с контрольной группой. Так, M. Da Silva et al. (2015) выявили уменьшение размеров холинергических и нитрергических нейронов, а P. Talarca (2014) - всех нейронов при ТНБС-индуцированном колите у крыс. Таким образом, окрашивание по методу Ниссля позволяет достоверно оценить общее количество ганглиев и нейронов в них, но из-за вариабельности окрашивания энтеральных нейронов является недостаточно информативной для оценки их функционального состояния.

При остром колите мы не отметили каких-либо изменений и различий по выраженности иммунореактивности нейронов при использовании антител к таким маркерам как NuC/D или β III-тубулин на гистологических срезах и тотальных препаратах, что согласуется с данными литературы. Так, на модели ДСН-индуцированного колита не выявлено изменений экспрессии нейрональных маркеров (Winston J. et al., 2013). Однако, на модели ТНБДС/ДНБС-индуцированного колита показано уменьшение иммунореактивности энтеральных нейронов (Winston J. et al., 2013; Ippolito C. et al., 2015), что может быть связано как с уменьшением их числа, так и снижением экспрессии указанных маркеров.

При исследовании нитрергических нейронов при остром колите мы выявили уменьшение их относительной доли в дистальном отделе ободочной кишки, что согласуется с данными литературы. На модели ДСН-индуцированного колита у крыс (Mizuta Y. et al., 2000) и мышей (Gulbransen B. et al., 2012) описано снижение доли нитрергических нейронов. Это может происходить как из-за избирательного повреждения и гибели нитрергических нейронов, так и из-за снижения иммунореактивности nNOS в их цитоплазме. Так как нитрергические нейроны, в первую очередь, тормозные мотонейроны, необходимые для перистальтического рефлекса, то снижение их числа или уровня экспрессии nNOS в них может косвенно отражать нарушения моторной функции кишки (Фоканова О.А., Румянцева Т.А., 2016). На других моделях показана частичная обратимость уменьшения числа нитрергических нейронов ЭНС. Так О.А. Фоканова и Т.А. Румянцева (2006, 2016, 2017) описывают уменьшение количества НАДФ-д-позитивных нитрергических нейронов в прямой кишке у

крыс в ранние сроки после деафферентации или десимпатизации с последующим частичным восстановлением их количества.

При ультраструктурном исследовании миентеральных ганглиев мы не обнаружили признаков гибели нейронов или глиальных клеток при остром колите. Отдельные аксоны подвергались некрозу, однако количество таких аксонов было небольшим. В литературе отсутствуют данные об ультраструктурных изменениях ЭНС при остром ДСН-индуцированном колите. При ТНБС-индуцированном колите у крыс выявляются ультраструктурные признаки апоптоза миентеральных нейронов (Talarca P., 2014). При ЯК и БК у человека обнаружен некроз нейронов, их отростков и глиальных клеток (Dvorak A. et al., 1980, 1993; Steinhoff M. et al., 1988). Полученные нами при ультраструктурном исследовании данные подтверждают результаты других примененных нами методов исследования ЭНС и указывают на ограниченное повреждение аксонов, которое, по-видимому, имеет обратимый характер.

Важным компонентом ЭНС являются нервные волокна, состоящие из аксонов, глиальных клеток и их отростков, обеспечивающих иннервацию мышечной и слизистой оболочки. При остром колите мы выявили увеличение количества и относительной площади нервных волокон в циркулярном слое мышечной оболочки. При ультраструктурном исследовании отмечена дезорганизация соединительной ткани вокруг нервных волокон, тем не менее количество аксонов с признаками некроза было небольшим. Полученные результаты согласуются с данными литературы. При ВЗК отмечена гипертрофия или гиперплазия нервных волокон в мышечной оболочке, более характерная для БК (Geboes K., Collins S., 1998; Villanacci V. et al., 2008). На модели экспериментального ТНБС колита показано или отсутствие изменений количества нервных волокон в мышечной оболочке (Sanovic S. et al., 1999), или уменьшение их числа в ранние сроки острого воспаления и значительный рост их количества в более позднем периоде (Lourenssen S. et al., 2005). На модели ДСН-индуцированного колита также показано увеличение числа нервных волокон в мышечной оболочке (Blennerhassett M. et al., 2017; Cervi A. et al., 2017). Повышение числа нервных волокон может быть связано как с их гиперплазией в ответ на воспаление (Moynes D., 2014), так и с их компактизацией из-за уменьшения расстояния между отдельными волокнами по причине сокращения гладких миоцитов. С учетом уменьшения длины кишки при остром колите на 40%, компактизация, очевидно, вносит наибольший вклад в наблюдаемое увеличение площади и количества нервных волокон в мышечной оболочке. При ультраструктурном исследовании изменения внутримышечных волокон аналогичны таковым в ганглиях и характеризуются дегенерацией отдельных аксонов.

Энтеральные глиальные клетки играют важную роль в функционировании ЖКТ (Gulbransen B., Brown I., 2014; Sharkey K., 2015; Grubišić V., Gulbransen B., 2017; Rao M., Gershon M., 2016). В нашем исследовании показано, что при остром колите количество глиальных клеток в миентеральных ганглиях на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, уменьшилось. На тотальных препаратах, маркированных антителами к S100b, несмотря на значительное повышение числа миентеральных нейронов, количество глиальных клеток в миентеральных ганглиях и нервных трактах не отличалось от контрольной группы, а нейрон-глиальный индекс возрос. При остром колите на фоне роста числа нервных волокон в мышечной оболочке количество глиальных клеток и их относительная площадь не изменились, в то время как их средний диаметр уменьшился.

Следовательно, в целом число глиальных клеток при ДСН-индуцированном остром колите у мышей C57Bl/6 сократилось. Наблюдаемые нами изменения глиальных клеток обусловлены, очевидно, их гибелью или снижением экспрессии их маркеров. Полученные нами результаты согласуются с данными одних авторов и не соответствуют результатам других. Так, M. Da Silva et al. (2015) показали уменьшение числа глиальных клеток при ТНБС-индуцированном колите. В культуре отмечено снижение уровня пролиферации глиальных клеток, полученных от мышей с ДСН-индуцированным колитом (Moynes D., 2014). У человека при БК и ЯК вариабельное увеличение числа глиальных клеток, отмечено в пораженных участках кишки, а вне участков воспаления при БК отмечено снижение числа глиальных клеток (Villanacci V. et al., 2008). У больных ЯК также показано снижение нейрон-глиального отношения (Bernardini N. et al., 2012). В литературе отсутствуют сведения об изменении нейроглии в составе нервных волокон при экспериментальном остром ДСН-индуцированном колите. Соотношение числа нейронов и глиальных клеток является важным показателем их взаимодействия (Худоевков Р.М., 2014). Выявленное нами снижение относительного или абсолютного числа глиальных клеток в ободочной кишке при остром колите у мышей может быть связано с их избирательной гибелью или потерей их иммунореактивности. Экспрессия глиальных маркеров в большей степени чем нейрональные зависит от функционального состояния клеток (Gulbransen B., Brown I., 2014; Grubišić V., Gulbransen B., 2017). Протеин S100b, используемый в нашем исследовании в качестве маркера глиальных клеток ЭНС, позволяет выявить большинство глиальных клеток ЭНС, но его уровень отличается лабильностью и этот белок способен к экзоцитозу при активации глиии (Cirillo C. et al., 2011; Grubišić V., Gulbransen B., 2017). Наиболее вероятной причиной уменьшения нейроглии в миентеральных ганглиях в нашем исследовании является ее избирательная гибель. Глиальные клетки в ганглиях в большей степени контактируют с межклеточной средой чем тела нейронов

и поэтому, вероятно, они более чувствительны к повреждению при остром колите. Повышение нейрон-глиального отношения может быть одной из причин изменения функции ЭНС при остром воспалении. Глиальные клетки активно участвуют в процессах поддержания локального гомеостаза и эпителиального барьера (Neunlist M. et al., 2013; Yu Y., Li Y.Q., 2014), могут быть антиген-презентирующими клетками, они способны продуцировать цитокины и инициировать воспалительный ответ, в том числе опосредованно через продукцию NO (Boyen von G., Steinkamp M., 2011; Cirillo C. et al., 2011). Глиальные клетки ЭНС, взаимодействия с нейронами, могут регулировать моторную функцию, процессы секреции, всасывания питательных веществ и кровотока органов ЖКТ (Ochoa-Cortes F. et al., 2016). Энтеральная глия участвует в нормальном функционировании синапсов, а ее сеть способна к проведению внутриклеточных кальциевых волн, модулирующих моторную активность кишки (Cirillo C. et al., 2011; Gulbransen B., Brown I., 2014). Поражение нейроглии может приводить к ослаблению моторной активности и снижению иммунореактивности NO в миентеральных нейронах (Cirillo C. et al., 2011), что наблюдается и в нашем эксперименте, а избирательная элиминация глиальных клеток приводит к развитию энтероколита (Cornet A. et al., 2001). В тоже время при воспалении глия ЭНС может активироваться (Ochoa-Cortes F. et al., 2016). Таким образом, снижение относительного числа глиальных клеток в миентеральных ганглиях, даже при увеличении числа нейронов, может приводить к нарушениям функции толстой кишки.

Изменения субмукозного сплетения при остром ДСН-индуцированном колите были более выраженными чем миентерального. В зонах язвенного дефекта в нашем исследовании отмечено увеличение площади, количества и среднего диаметра нервных волокон, причем наиболее их количество локализовалось в поверхностных отделах язв. Несмотря на это, при исследовании ультраструктуры нервных волокон в области язв выявлялись лишь единичные аксоны с признаками некроза. K. Nurgali et al. (2011) отметили реинервацию слизистой оболочки подвздошной кишки на 7-ые сутки после индукции ТНБС илеита у морских свинок. K. Geboes et al. (1998) указывают на гипертрофию нервных волокон при БК и при ЯК, а A. Dvorak et al. (1980) отмечает выраженный аксональный некроз. Выявленные нами изменения могут быть связаны как с компактизацией субмукозного сплетения из-за повреждения слизистой оболочки, так и образования нервных волокон *de novo* на фоне воспалительного процесса. Устойчивость нервных волокон в СПСО к повреждению обусловлена, вероятно, их отграниченностью от окружающих тканей коллагеновыми фибриллами и отростками глиальных клеток.

При остром колите у самцов мышей C57Bl/6 в СПСО в отличие от мышечной оболочки повысилось число S100b-положительных клеток. У больных ВЗК отмечено снижение

количества S100b-положительных клеток в СПСО (Kubota Y. et al., 1992). При ТНБС-индуцированном колите количество глиальных клеток в субмукозных ганглиях уменьшается (Da Silva M. et al., 2017). Выявленное нами увеличение числа S100b-положительных клеток может быть связано с пролиферацией глии в ответ на воспаление, так как по данным литературы нейроглия способна пролиферировать при воспалительном процессе в стенке кишки (Joseph J. et al., 2011). Другой возможной причиной выявленного нами увеличения числа S100b-положительных клеток является массивный экзоцитоз протеина S100b из мукозальных глиальных клеток с последующим его захватом макрофагами, которые тоже становятся S100b-положительными. Следовательно, использование лишь одного глиального маркера не позволяет с уверенностью ответить на вопрос о причинах повышения количества S100b-позитивных клеток в СПСО. В исследованиях показано, что энтеральная нейроглия оказывает протективный эффект на целостность эпителиального барьера (Yu Y.B., Li Y.Q., 2014). Энтеролия способна выделять нейротрофические факторы (Coelho-Aguiar J. et al., 2015), а протеин S100b может оказывать провоспалительный эффект, связанный с продукцией NO. Показатели количества этого белка увеличиваются в слизистой оболочке прямой кишки у больных ЯК (Cirillo C. et al., 2011). Нарушение эпителиального барьера при ДСН-индуцированном колите может приводить к пролиферации мукозальной нейроглии и активному экзоцитозу протеина S100b в межклеточное вещество.

Таким образом, при остром ДСН-индуцированном колите структурные изменения ЭНС обусловлены сочетанием процессов компактизации, альтерации, функциональной перестройки и гиперплазии. Компактизация миентерального и субмукозного сплетения приводит к наиболее выраженным качественным и количественным морфологическим изменениям ЭНС, она является следствием сокращения гладких миоцитов и повреждения СПСО, и характеризуется увеличением числа ганглиев и миентеральных нейронов, площади и количества нервных волокон в мышечной и слизистой оболочке, а также волнообразностью нервных трактов. Функциональные изменения энтеральных нейронов характеризуются изменением хромности миентеральных нейронов и их размера и увеличением количества нейрональной каспазы-3, а альтерация приводит к снижению доли нитрергических нейронов в миентеральных ганглиях, истончению нервных трактов и дегенерации нервных отростков, и уменьшению количества глиальных клеток в мышечной оболочке и ганглиях. Гиперплазия нервных отростков наблюдается и в мышечной оболочке, и в СПСО, но в последней более выражена, в ней также отмечено повышение числа S100b-позитивных клеток. В целом, ЭНС ободочной кишки при тяжелом остром ДСН-индуцированном колите у самцов мышей C57Bl/6

характеризуется относительной устойчивостью и процессы альтерации в ней сочетаются с процессами репарации.

Изменения ЭНС, выявляемые при хроническом ДСН-индуцированном колите, менее выражены чем при остром. У мышей с хроническим колитом длина ободочной кишки и средняя толщина мышечной оболочки не отличались от контрольной группы. При хроническом колите время транзита кармина красного через ЖКТ возросло, что вероятно связано, как и при остром колите, со стазом кишечного содержимого. Это согласуется с данными литературы (Yeom Y., Kim Y., 2015). Относительная доля жидкости в кале не изменилась. Следовательно, несмотря на отсутствие макроскопических признаков воспаления и на фоне минимальных клинических проявлений, при хроническом колите отмечается нарушение функции ЖКТ.

Гисторахитектоника миентерального сплетения, выявляемая на тотальных препаратах, маркированных βIII-тубулином у мышей с хроническим колитом не отличалась от таковой у животных контрольной группы. На гистологических срезах при хроническом колите отмечено снижение числа миентеральных ганглиев в проксимальном отделе и субмукозных в дистальном. Как и у животных с острым колитом в ганглиях не выявлено клеток воспалительного инфильтрата. В литературе нет сведений о морфологических изменениях ЭНС при хроническом ДСН-индуцированном колите. Сравнение ТНБС/ДНБС и хронического ДСН-индуцированного колита не совсем корректно, так как в отдаленном периоде после индукции ТНБС/ДНБС колита воспалительный процесс в толстой кишке разрешается и наблюдаются процессы фиброза. ТНБС/ДНБС-индуцированный колит также характеризуется вовлечением в воспаление мышечной оболочки, чего не наблюдается при ДСН-индуцированном колите. A. Lin et al. (2005) на 35-ые сутки после индукции ТНБС-индуцированного колита выявили уменьшение числа небольших ганглиев. Снижение количества миентеральных ганглиев в проксимальном отделе ободочной кишки при хроническом ДСН-индуцированном колите у мышей связано, вероятно, с изменением ее тонуса. По нашим данным при хроническом ДСН-индуцированном колите воспалительные изменения были более выражены в проксимальном отделе, чем в дистальном. Уменьшение числа субмукозных ганглиев в дистальном отделе ободочной кишки также, очевидно, обусловлено изменением тонуса кишки.

Общее количество миентеральных нейронов в ободочной кишке у мышей с хроническим колитом не отличалось от такового у животных контрольной группы, что согласуется с данными литературы. При ТНБС/ДНБС-индуцированном колите отмечается резкое снижение количества нейронов в первые часы и сутки после индукции колита, и оно

остаётся стабильно низким до 56-ых суток (Sanovic S. et al., 1999; Lin S. et al. 2005; Linden D. et al., 2005; Ippolito C. et al., 2015). E. Poli et al. (2001) отмечают восстановление миентерального сплетения у крыс на 30-ые сутки после индукции колита ТНБС. Отсутствие изменения числа нейронов при хроническом колите в нашем исследовании свидетельствует о восстановлении гистоархитектоники ЭНС.

У животных с хроническим колитом в дистальном отделе ободочной кишки возросло количество гиперхромных нейронов. Размеры миентеральных нейронов и их ядер в медиальном отделе ободочной кишки уменьшились, при этом увеличился ядерно-цитоплазматический индекс нейронов. Это может быть связано с функциональной перестройкой миентеральных нейронов. При хроническом колите по сравнению с контрольной группой не отмечено изменения доли нитрергических нейронов в миентеральных ганглиях или количества гранул каспазы-3 в энтеральных нейронах. В энтеральных ганглиях не выявлено Ki67-позитивных клеток также как в контроле и при остром колите. Следовательно, функциональные изменения нейронов при хроническом ДСН-индуцированном колите менее выражены чем при остром.

При хроническом колите не отмечено изменений числа глиальных клеток в миентеральных ганглиях. Как и при остром колите увеличение площади и количества нервных волокон в мышечной оболочке не сопровождалось ростом числа внутримышечных глиальных клеток. Это указывает на сохраняющееся уменьшение их относительного количества. В литературе мало сведений об изменениях нейроглии при экспериментальном хроническом колите. При ДНБС-индуцированном колите на 21-ые сут С. Ippolito et al. (2015) выявили увеличение экспрессии GFAP, а N. Joseph et al. (2011) пролиферацию глиальных клеток в мышечной оболочке.

В нашем исследовании при хроническом ДСН-индуцированном колите не выявлено качественных и количественных изменений нервных волокон в СПСО. В тоже время сохранялось повышение количества S100b-положительных клеток в СПСО и подслизистой основе. Большое количество S100b-позитивных клеток располагалось в составе воспалительного инфильтрата. Наши результаты совпадают с данными других исследователей. При ДСН-индуцированном хроническом колите отмечено увеличение числа тирозин гидроксилаза-позитивных волокон в мышечной оболочке, но не в слизистой (Cervi A. et al., 2017).

Таким образом, при ДСН-индуцированном хроническом колите выявленные нами изменения ЭНС характеризуются гипертрофией и гиперплазией структур ЭНС, а процессы компактизации и альтерации не выражены. Выявленные структурные изменения ЭНС при

хроническом ДСН-индуцированном колите у самцов мышей C57Bl/6 указывают на ее долговременную и устойчивую нейропластическую адаптацию.

ВЫВОДЫ

1. Энтеральная нервная система ободочной кишки у мышей C57Bl/6 в норме характеризуется сложной трехмерной гистоархитектоникой и представлена миентеральным и субмукозным нервными сплетениями, образованными сетью ганглиев, соединяющих их нервных трактов и волокон разного диаметра. По сравнению с проксимальным отделом ободочной кишки в дистальном количество субмукозных ганглиев меньше.
2. В миентеральных ганглиях у мышей в норме преобладают нормо- и гипохромные нейроны, 27% из них являются нитрергическими, а в цитоплазме большинства содержится небольшое количество каспаза-3-положительных гранул. Нервные волокна и S100b-позитивные клетки располагаются между криптами в собственной пластинке слизистой оболочки.
3. При остром колите, индуцированном у мышей C57Bl/6 декстрансульфатом натрия, показатели длины ободочной кишки уменьшаются на 40%, в слизистой оболочке наблюдается распространенный язвенно-воспалительный процесс, а в мышечной оболочке воспалительные изменения не выражены. В ободочной кишке выявляется компактизация миентерального нервного сплетения: на гистологических срезах в 4 раза возрастает количество миентеральных ганглиев, а на тотальных препаратах мышечной оболочки на 73% – число HuC/D-положительных нейронов, при этом Ki67-положительных клеток в ганглиях не выявлено.
4. Морфофункциональные изменения нейронов в миентеральных ганглиях при экспериментальном остром колите характеризуются снижением на 27% относительного количества нитрергических и на 40% гипохромных нейронов, увеличением числа нейронов с большим количеством каспаза-3-позитивных гранул в цитоплазме. По сравнению с контрольной группой при остром колите число глиальных клеток на окрашенных по методу Ниссля гистологических препаратах уменьшается, а нейрон-глиальное отношение на тотальных препаратах - увеличивается в 1,7 раза, что обусловлено уменьшением количества глиальных клеток.
5. При экспериментальном остром колите нервные тракты на тотальных препаратах мышечной оболочки, маркированных антителами к β III-тубулину, истончены и имеют извитой вид. На гистологических срезах площадь внутримышечных β III-тубулин-положительных нервных волокон возрастает на 21%, а их количество - на 27%. Эти изменения обусловлены компактизацией миентерального сплетения и в меньшей степени

гиперплазией нервных волокон. При ультраструктурном исследовании нервных волокон выявлена дегенерация отдельных аксонов.

6. При экспериментальном остром колите изменения субмукозного сплетения более выражены, чем миентерального, и характеризуются увеличением площади, количества и толщины β III-тубулин-положительных нервных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки. При ультраструктурном исследовании в нервных волокнах выявляется дегенерация отдельных аксонов. Число S100b-положительных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки возрастает в 5 раз.
7. При экспериментальном хроническом колите у мышей выявляется нарушение моторной функции желудочно-кишечного тракта, характеризующееся уменьшением времени транзита красителя. При морфологическом исследовании определяется лимфоцитарно-плазмоцитарная воспалительная инфильтрация слизистой оболочки ободочной кишки. Изменения гистоархитектоники энтеральной нервной системы не выражены. Наблюдаются региональные изменения морфофункционального состояния нейронов миентеральных ганглиев: в медиальном отделе ободочной кишки уменьшается их размер, а в дистальном увеличивается количество гиперхромных нейронов. Выявляются гиперпластические изменения: возрастают площадь и количество внутримышечных нервных волокон, а в собственной пластинке слизистой оболочки многократно увеличивается число S100b-положительных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаева С.О. Гистофизиология слизистой оболочки тонкой и толстой кишки мышей Balb/c и C57Bl/6 при стрессорном холодовом воздействии : автореферат дис. кандидата биологических наук : 03.03.04 / Науч.-исслед. ин-т морфологии человека РАМН – Москва.– 2012. – 26 с.
2. Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия морфологических изменений и иммунных нарушений при экспериментальном остром язвенном колите // Клин. эксп. Морфология – 2016.– т. 17.– № 1.– с. 37-42
3. Ермохин П.Н. Гистопатология центральной нервной системы. Атлас микрофотографий / М.: Медицина.– 1969 г.–244 с.
4. Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нейрона / Л.: Медицина. – 1965 г.– С. 323
5. Ноздрачев А.Д. Физиология вегетативной нервной системы / Л.: Медицина. – 1983. – С. 296.
6. Орехова Е.В. Морфологические изменения нервных структур кишечника в динамике экспериментального острого разлитого перитонита: автореф. дис. канд. мед. наук :14.00.15 / 1-й Моск. мед. ин-т им. И. М. Сеченова. — М, 1990 г. — 20 с.
7. Пестерева М.Л. Компенсаторно-приспособительные и дистрофические изменения интрамуральных нервных структур тощей кишки: автореф. дис. канд. мед. наук :14.00.02 / С.-Петербург. гос. педиатр. мед. акад. — СПб, 1999 г. —19 с.
8. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника // М.: Советская наука. – 1957.– с. 469.
9. Савицкая М.А., Онищенко Г. Е. Механизмы апоптоза // Биохимия. – 2015.– т. 80.– № 11.– с. 1613-1627
10. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е., Волынская Е.И. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем // Гастроэнтерология практическая медицина. – 2012 г.– Т. 3.– № 58.– с. 17-22
11. Фоканова О.А., Румянцева Т.А. Изменения NADPH-d-позитивных нейронов интрамуральных ганглиев прямой кишки под влиянием капсаицина // УСН – 2017.– т. 2.– № 2.– с. 207-210
12. Фоканова О.А., Румянцева Т.А. Морфологические характеристики NADPH-d-позитивных нейронов интрамуральных узлов прямой кишки крыс разного возраста в норме и при химической десимпатизации // УСН. – 2016.– т. 5.– № 12.–с. 163-166
13. Хауликэ И. Вегетативная нервная система - Анатомия и физиология / Медицинское издательство Бухарест. – 1978. – С. 54-56.
14. Худерков Р.М. Методы компьютерной морфометрии в нейроморфологии / М.:ФГБУ «НЦН» РАМН.– 2014.– 53 с.

15. Шилкин В.В., Румянцева Т.А., Агаджанова Л.С., Порсева В.В., Фоканова О.А. NADPH-позитивные нейроны в периферической нервной системе половозрелой крысы // Морфология. – 2004.– Т. 126.– № 4.– с. 143.
16. Яковлев, А. А. Неапоптотическая роль каспазы-3 в мозге: автореф. дис. канд. физ.-мат. наук : 03.00.02 / А.А. Яковлев. – М., 2004. – 24 с.
17. Allen D.T., Kiernan J.A. Permeation of proteins from the blood into peripheral nerves and ganglia // *Neuroscience*. – 1994.– Vol. 59.–No. 3.–p. 755-64.
18. Allison M.C., Vallance R. Prevalence of proximal faecal stasis in active ulcerative colitis // *Gut*. – 1991.– Vol. 32.– No. 2.– p. 179-82.
19. Araújo E.J., Sant'Ana Dde M., Molinari S.L., de Miranda Neto M.H. Regional differences in the number and type of myenteric neurons in the descending colon of rats // *Arq Neuropsiquiatr.* – 2003. – Vol. 61.– No. 2A.– p. 220-5.
20. Aulí M., Fernández E. Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis* // *Dig Dis Sci.* – 2005.– Vol. 50.– No. 8.–p. 1432-43.
21. Azan G., Low W.C., Wendelschafer-Crabb G., Ikramuddin S., Kennedy W.R. Evidence for neural progenitor cells in the human adult enteric nervous system // *Cell Tissue Res.* – 2011.–Vol. 344.–No. 2.– p. 217-25.
22. Balemba O.B., Grøndahl M.L., Mbassa G.K., Semuguruka W.D., Hay Smith A. The organisation of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry // *J. Anat.* –1998.– Vol.192.– p. 257-267.
23. Bassotti G., Antonelli E., Villanacci V., Baldoni M., Dore M.P. Colonic motility in ulcerative colitis // *United European Gastroenterol J.* – 2014. – Vol. 2.– No. 6.– p. 457-462.
24. Bassotti G., Villanacci V., Nascimbeni R., Cadei M., Fisogni S., Antonelli E., Corazzi N., Salerni B. Enteric neuroglial apoptosis in inflammatory bowel diseases // *J Crohns Colitis.*– 2009.– Vol. 3.– No. 4.–p. 264-70.
25. Bayliss W. M., Starling E. H. The movements and innervation of the small intestine // *J Physiol.* – 1899.– Vol. 24.– No. 2.–p. 99-143
26. Beck D.E., Roberts P.L., Saclarides T.J., Senagore A.J., Stamos M.J., Nasser Y. The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery Second Edition / Springer-Verlag.– New York.– 2011.– 946 p.
27. Belai A., Boulos P.B., Robson T., Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease // *Gut*. – 1997.– Vol. 40.– No. 6.–p. 767-74.
28. Belkind-Gerson J., Hotta R., Nagy N., Thomas A.R., Graham H., Cheng L., Solorzano J., Nguyen D., Kamionek M., Dietrich J., Cherayil B.J., Goldstein A.M. Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT₄-dependent mechanism // *Inflamm Bowel Dis.* – 2015. – Vol. 21.– No. 4.–p. 870-8.

29. Bernardini N., Segnani C., Ippolito C., De Giorgio R., Colucci R., Fausone-Pellegrini M.S., Chiarugi M., Campani D., Castagna M., Mattii L., Blandizzi C., Dolfi A. Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis // *J Cell Mol Med.* – 2012.– Vol. 16.– No. 2.–p. 318-27.
30. Bielefeldt K., Gebhart G.F. Chapter 3. Gut-to-Brain Signaling: Sensory Mechanisms / Pathophysiology of the enteric nervous system : a basis for understanding functional diseases. 1st ed. Robin Spiller, David Grundy (eds.) // Wiley. – 2004. – 272 p.
31. Bishop A.E., Polak J.M., Bryant M.G., Bloom S.R., Hamilton S. Abnormalities of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in Crohn's disease // *Gastroenterology.* – 1980. – Vol. 79. – No. 5 Pt 1.– p. 853-60.
32. Blennerhassett M.G., Lourenssen S.R., Parlow L.R.G., Ghasemlou N., Winterborn A.N. Analgesia and mouse strain influence neuromuscular plasticity in inflamed intestine // *Neurogastroenterol Motil.* – 2017. Vol. 29.– No. 10.–p. 1-12.
33. Boyen von G., Steinkamp M. The role of enteric glia in gut inflammation // *Neuron Glia Biol.* – 2010.– Vol. 6.– No. 4.– p. 231-6.
34. Boyer L., Ghoreishi M., Templeman V., Vallance B.A., Buchan A.M., Jevon G., Jacobson K. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis // *Auton Neurosci.* – 2005.– Vol. 117.– No. 1. – p. 41-53.
35. Brehmer A., Blaser B., Seitz G., Schrodll F., Neuhuber W. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine // *Histochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol.121. – p. 13-20.
36. Brehmer A., Schrodll F., Neuhuber W. Morphological classifications of enteric neurons-100 years after Dogiel // *Anat Embryol (Berl).* – 1999.– Vol. 200.– No.2.– p. 125-35.
37. Brehmer A., Schrödl F., Neuhuber W. Correlated morphological and chemical phenotyping in myenteric type V neurons of porcine ileum // *W. J Comp Neurol.* – 2002. – Vol. 453.– No. 1.– p. 1-9.
38. Brenna Ø., Furnes M.W., Drozdov I., van Beelen Granlund A., Flatberg A., Sandvik A.K., Zwiggelaar R.T., Mårvik R., Nordrum I.S., Kidd M., Gustafsson B.I. Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histologic and Transcriptomic [corrected] characterization and correlation to IBD // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8.– No. 1.– p. e54543.
39. Brierley S. Chapter 9. Altered Ion Channel/Receptor Expression and Function in Extrinsic Sensory Neurons: The Cause of and Solution to Chronic Visceral Pain? / *The Enteric Nervous System: 30 Years Later (Advances in Experimental Medicine and Biology)*. Brierley S., Costa M. (eds.) // Springer.– 2016.– 250 p.
40. Brierley S.M., Linden D.R. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2014. – Vol. 11. – No. 10.– p. 611-27.
41. Brookes S., Chen N., Humenick A., Spencer N., Costa M. Chapter 7. Extrinsic Sensory Innervation of the Gut: Structure and Function / *The Enteric Nervous System: 30 Years Later (Advances in Experimental Medicine and Biology)*. Brierley S., Costa M. (eds.) // Springer.– 2016.– 250 p.

42. Brown I.A., McClain J.L., Watson R.E., Patel B.A., Gulbransen B.D. Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2016.–Vol. 2.– No. 1.–p. 77-91.
43. Burnett M.G., Zager E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review // *Neurosurg Focus.* – 2004.–Vol. 16.– No. 5.– p. E1.
44. Carlson G.M., Bedi B.S., Code C.F. Mechanism of propagation of intestinal interdigestive myoelectric complex // *Am. J. Physiol.* – 1972. – Vol. 222. – p. 1027-1030.
45. Cervi A.L., Moynes D.M., Chisholm S.P., Nasser Y., Vanner S.J., Lomax A.E. A role for interleukin 17A in IBD-related neuroplasticity // *Neurogastroenterol Motil.* – 2017 Epub ahead of print
46. Cirillo C., Sarnelli G., Cuomo R. Enteric Nervous System Abnormalities in Ulcerative Colitis / *Ulcerative Colitis – Epidemiology, Pathogenesis and Complications.*M.B. O'Connor (eds) // *InTech.*– 2011.– 292 p.
47. Cirillo C., Sarnelli G., Esposito G., Turco F., Steardo L., Cuomo R. S100B protein in the gut: The evidence for enteroglial-sustained intestinal inflammation // *World J Gastroenterol.*– 2011.– Vol. 17. – No 10.– p. 1261-1266.
48. Coburn C., Allman E., Mahanti P., Benedetto A., Cabreiro F., Pincus Z., Matthijssens F., Araiz C., Mandel A., Vlachos M., Edwards S.A., Fischer G., Davidson A., Pryor R.E., Stevens A., Slack F.J., Tavernarakis N., Braeckman B.P., Schroeder F.C., Nehrke K., Gems D. Anthranilate fluorescence marks a calcium-propagated necrotic wave that promotes organismal death in *C. elegans* // *PLoS Biol.* – 2013.Vol. 11.– No.7. –p. e1001613.
49. Coelho-Aguiar Jde M., Bon-Frauches A.C., Gomes A.L., Veríssimo C.P., Aguiar D.P., Matias D., Thomasi B.B., Gomes A.S., Brito G.A., Moura-Neto V. The enteric glia: identity and functions // *Glia.* – 2015.– Vol. 63.– No.6.– p. 921-35.
50. Colpaert E.E., Timmermans J.P., Lefebure R.A Immunohistochemical localization of the antioxidant enzymes biliverdin reductase and heme oxygenase-2 in human and pig gastric fundus // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2002. – Vol. 32. – p. 630-637.
51. Cornet A., Savidge T.C., Cabarrocas J., Deng W.L., Colombel J.F., Lassmann H., Desreumaux P., Liblau R.S. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001.– Vol. 98.– No. 23.– p. 13306-11.
52. Costa M., Furness J.B. Chapter 10. Nervous Control of Intestinal Motility / *Mediators and Drugs in Gastrointestinal Motility I. Handbook of Experimental Pharmacology* // Continuation of *Handbuch der experimentellen Pharmakologie* Springer, Berlin, Heidelberg. – 1982.
53. da Silva M.V., Marosti A.R., Mendes C.E., Palombit K., Castelucci P. Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons // *Histochem Cell Biol.* – 2015.– Vol. 143.No. 2.–p. 171-84.
54. da Silva M.V., Marosti A.R., Mendes C.E., Palombit K., Castelucci P. Submucosal neurons and enteric glial cells expressing the P2X7 receptor in rat experimental colitis // *Acta Histochem.* – 2017. – Vol. 119.–No. 5.– p. 481-494.

55. D'Amelio M., Cavallucci V., Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death // *Cell Death Differ.* – 2010. – Vol. 17. – No. 7. – p. 1104-14.
56. Desmet A.S., Cirillo C., Vanden Berghe P. Distinct subcellular localization of the neuronal marker HuC/D reveals hypoxia-induced damage in enteric neurons // *Neurogastroenterol Motil.* – 2014. – Vol. 26. – No. 8. – p. 1131-43.
57. Dinning P.G. Chapter 20. Recording In Vivo Human Colonic Motility: What Have We Learnt Over the Past 100 Years? / *The Enteric Nervous System: 30 Years Later (Advances in Experimental Medicine and Biology)*. Brierley S., Costa M. (eds.) // Springer. – 2016. – 250 p.
58. Dusdieker N.S., Summers R.W. Longitudinal and circumferential spread of spike bursts in canine jejunum in vivo // *Am J Physiol.* – 1980. – Vol. 293. – p. G311-G318.
59. Dvorak A.M., Onderdonk A.B., McLeod R.S., Monahan-Earley R.A., Cullen J., Antonioli D.A., Blair J.E., Morgan E.S., Cisneros R.L., Estrella P. Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches. Possible implications for pathogenesis of Crohn's disease // *Ann Surg.* – 1993. – Vol. 217. – No. 3. – p. 260-71.
60. Dvorak A.M., Osage J.E., Monahan R.A., Dickersin G.R. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system // *Hum Pathol.* – 1980. Vol. 11. – No. 6. – p. 620-34.
61. Ekblad E., Hakanson R., Sundler F. Innervation of the stomach of rat and man with special reference to the endocrine cells / *The Stomach as an Endocrine Organ*. Hakanson R., Sundler F. (eds) // Elsevier Science Publishers Biomedical Division. – Amsterdam. – 1991. – 548 p.
62. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – No. 4. – p. 495-516.
63. Feng B., La J.H., Schwartz E.S., Tanaka T., McMurray T.P., Gebhart G.F. Long-term sensitization of mechanosensitive and -insensitive afferents in mice with persistent colorectal hypersensitivity // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2012. – Vol. 302. – No. 7. – p. G676-83.
64. Furlan R., Ardizzone S., Palazzolo L., Rimoldi A., Perego F., Barbic F., Bevilacqua M., Vago L., Bianchi Porro G., Malliani A. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – No 1. – p. R224-32.
65. Furness J.B. Chapter 16. Integrated Neural and Endocrine Control of Gastrointestinal Function / *The Enteric Nervous System: 30 Years Later (Advances in Experimental Medicine and Biology)*. Brierley S., Costa M. (eds.) // Springer. – 2016. – 250 p.
66. Furness J.B. The enteric nervous system and neurogastroenterology // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* – 2012. – No 9. – p. 286-294.
67. Furness J.B., Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system // *Neuroscience.* – 1980. – Vol. 5. – p. 1-20.
68. Furness J.B., Stebbing M.J. The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems // *Neurogastroenterol Motil.* – 2017. – Epub ahead of print
69. Furness J. B. *The Enteric Nervous System* // Blackwell, Oxford. – 2006. – 288 p.

70. Gabella G. On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia // *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* – 1982. – Vol.71. – p. 15-25.
71. Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep // *Neuroscience* – 1987. –Vol. 22. –p. 737-752.
72. Gamage P.P., Ranson R.N., Patel B.A., Yeoman M.S., Saffrey M.J. Myenteric neuron numbers are maintained in aging mouse distal colon // *Neurogastroenterol Motil.* – 2013. – Vol. 25. – No. 7. – p. e495-e505.
73. Gao J., Du P., O'Grady G., Archer R., Farrugia G., Gibbons S.J., Cheng L.K. Numerical metrics for automated quantification of interstitial cell of Cajal network structural properties // *J R Soc Interface.* – 2013. – Vol.10. – No.86.– p. 20130421
74. Geboes K., Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis // *Neurogastroenterol Motil.* – 1998. –Vol. 10. – No.3.– p. 189-202.
75. Geboes K., Rutgeerts P., Ectors N., Mebis J., Penninckx F., Vantrappen G., Desmet V.J. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease // *Gastroenterology.* – 1992. –Vol. 103. – No. 2. – p. 439-47.
76. Genton L., Kudsk K.A. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition // *Am J Surg.* – 2003. – Vol.186. – No. 3. – p. 253-258.
77. Gershon M.D. Behind an enteric neuron there may lie a glial cell // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121.–No.9. – p.3386-9.
78. Gershon M.D. Development of the enteric nervous system / *Innervation of the Gastrointestinal Tract.* Brookes S.J.H., Costa M. (eds) // Taylor & Francis.– London and New York. – 2002. –560 p.
79. Gershon M.D., Bursztajn S. Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa // *J Comp Neurol.* – 1978. – Vol. 180. – No. 3. – p. 467-88.
80. Geske F.J., Lieberman R., Strange R., Gerschenson L.E. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible // *Cell Death Differ.* – 2001.– Vol.8.–No. 2.– p. 182-91.
81. Golstein P., Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition // *Trends Biochem Sci.* – 2007.– Vol. 32. – No. 1. – p.37-43.
82. Gombash Lampe S.E., Kaspar B.K., Foust K.D. Intravenous injections in neonatal mice // *J Vis Exp.* – 2014. – Vol. 93. – p. e52037.
83. Goto K., Kato G., Kawahara I., Luo Y., Obata K., Misawa H., Ishikawa T., Kuniyasu H., Nabekura J., Takaki M. In Vivo Imaging of Enteric Neurogenesis in the Deep Tissue of Mouse Small Intestine // *PLoS One.* – 2013.– Vol. 8. – No. 1. – p. e54814.
84. Grubišić V., Gulbransen B.D. Enteric glia: the most alimentary of all glia // *J Physiol.* – 2017.– Vol. 595.– No.2.– p.557-570.
85. Gulbransen B., Brown I. Enteric Glial Cells: Implications in Gut Pathology / *Pathological Potential of Neuroglia.* Parpura V., Verkhratsky A. (eds.) // Springer, New York, NY, –2014.–541 p.
86. Gulbransen B.D., Bashashati M., Hirota S.A., Gui X., Roberts J.A., MacDonald J.A., Muruve D.A., McKay D.M., Beck P.L., Mawe G.M., Thompson R.J., Sharkey K.A. Activation of neuronal

- P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis // *Nat Med.* – 2012.– Vol. 18. No. 4. –p. 600-4.
87. Hanani M., Ermilov L.G., Schmalz P.F., Louzon V., Miller S.M., Szurszewski J.H. The three-dimensional structure of myenteric neurons in the guinea-pig ileum // *J Auton Nerv Syst.* – 1998. – Vol. 71. – No. 1. – p. 1-9.
88. Highley J., Sullivan N. Chapter 17. Techniques in neuropathology / *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 7-th edition.* Suvarna K.S., Layton C., Bancroft J.D. (eds.) // Churchill Livingstone.– 2013.– 654 p.
89. Hock M., Soták M., Kment M., Pácha J. The early effect of dextran sodium sulfate administration on carbachol-induced short-circuit current in distal and proximal colon during colitis development // *Physiol Res.* – 2011. –Vol. 60. – No. 6. – p. 921-31.
90. Horiguchi K., Semple G.S.A., Sanders K.M., Ward S.M. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum // *Physiol. (Lond.).* – 2001. – Vol.537. – No.1. – p. 237-250.
91. Horn C. Why is the neurobiology of nausea and vomiting so important? // *Appetite.* – 2008. Vol. 50. – No. 2–3.– p. 430-434.
92. Horn C.C., Kimball B.A., Wang H., Kaus J., Dienel S., Nagy A., Gathright G.R., Yates B.J., Andrews P.L. Why can't rodents vomit? A comparative behavioral, anatomical, and physiological study // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – No. 4. – p. e60537.
93. Howard E.R., Garrett J.R. The intrinsic myenteric innervation of the hind-gut and accessory muscles of defaecation in the cat // *Z. Zellforsch.* – 1973. – Vol.136. – p. 31-14.
94. Huebner E.A., Strittmatter S.M. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems // *Results Probl Cell Differ.* – 2009. – Vol. 48. – p. 339-51.
95. Huizinga J.D. Chapter 2. A Personal Perspective on the Development of Our Understanding of the Myogenic Control Mechanisms of Gut Motor Function / *The Enteric Nervous System: 30 Years Later (Advances in Experimental Medicine and Biology).* Brierley S., Costa M. (eds.) // Springer.– 2016.– 250 p.
96. Ibba-Manneschi L., Martini M., Zecchi–Orlandini S., Faussone-Pellegrini M.S. Histology and Histopathology Structural organization of enteric nervous system in human colon // *Histol Histopathol.* – 1995. – Vol. 10. – No. 1. – p. 17-25.
97. Ippolito C., Segnani C., Errede M., Virgintino D., Colucci R., Fornai M., Antonioli L., Blandizzi C., Dolfi A., Bernardini N. An integrated assessment of histopathological changes of the enteric neuromuscular compartment in experimental colitis // *J Cell Mol Med.* – 2015.– Vol.19. – No. 2. – p. 485-500.
98. Izumi N., Matsuyama H., Yamamoto Y., Atoji Y., Suzuki Y., Unno T., Takewaki T. Morphological and morphometrical characteristics of the esophageal intrinsic nervous system in the golden hamster // *Eur. J. Morphol.* – 2002. – Vol.40. – p. 137-144.
99. Jackson P., Blythe D. Chapter 18. Immunohistochemical techniques / *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 7–th edition.* Suvarna K.S., Layton C., Bancroft J.D. (eds.)// Churchill Livingstone.– 2013.– 654 p.

100. Jansson G., Lisander B., Martinson J. Hypothalamic control of adrenergic outflow to the stomach in the cat // *Acta Physiol. Scand.* – 1969. – Vol. 75. – p. 176-186.
101. Jiang Y., Dong H., Eckmann L., Hanson EM., Ihn KC., Mittal RK. Visualizing the enteric nervous system using genetically engineered double reporter mice: Comparison with immunofluorescence // *PLoS One.* – 2017.– Vol. 12.– No. 2. – p. e0171239
102. Jiang Y., Liu M.T., Gershon M.D. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas // *Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 258. – p. 364-384.
103. Joseph N.M., He S., Quintana E., Kim Y.G., Núñez G., Morrison S.J. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut // *J Clin Invest.*– 2011.–Vol. 121.– No. 9. – p. 3398-411.
104. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. Principles of Neural Science, 5th edition / McGraw-Hill Education. – 2012.– 1760 p.
105. Kapur R.P. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model // *Dev. Biol.* – 2000. – Vol. 227. – p. 146-155.
106. Karaosmanoglu T., Aygun B., Wade P.R., Gershon M.D. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons // *Anat Rec.* – 1996. – Vol. 244. – No. 4. – p. 470-80.
107. Kasperek M.S., Linden D.R., Farrugia G., Sarr M.G. Hydrogen sulfide modulates contractile function in rat jejunum // *J Surg Res.* – 2012. – Vol. 175. – No. 2.– p. 234-242.
108. Kinoshita K., Horiguchi K., Fujisawa M., Kobirumaki F., Yamato S., Hori M., Ozaki H. Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis // *Histochem Cell Biol.* – 2007.– Vol. 127. – No. 1.– p. 41-53.
109. Kirchgessner A.L., Liu M.T., Alcantara F. Excitotoxicity in the enteric nervous system // *J Neurosci.* – 1997.– Vol. 17. No. 22.–p. 8804-16
110. Kirchgessner A.L., Tamir H., Gershon M.D. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity // *Neurosci.* – 1992. – Vol.12. – p. 235-248.
111. Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights // *Exp Anim.* – 2000. – Vol. 49.– No. 1. – p. 9-15.
112. Knowles C.H., Veress B., Kapur R.P., Wedel T., Farrugia G., Vanderwinden J.M., Geboes K., Smith V.V., Martin J.E., Lindberg G., Milla P.J., De Giorgio R. Quantitation of cellular components of the enteric nervous system in the normal human gastrointestinal tract – report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group// *Neurogastroenterol Motil.* – 2011. – Vol. 23. – No. 2. – p.115-24.
113. Krammer H.J., Karahan S.T., Sigge W., Kuhnel W. Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon // *Eur J Pediatr Surg.* – 1994.–Vol. 4. – No. 5. – p. 274–8.

114. Krauter E.M., Strong D.S., Brooks E.M., Linden D.R., Sharkey K.A., Mawe G.M. Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig // *Neurogastroenterol Motil.* – 2007. – Vol. 19. – No.12. – p. 990-1000.
115. Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell Death Differ.* – 2009.– Vol. 16.– No. 1.– p. 3-11
116. Kubota Y., Petras R.E., Ottaway C.A., Tubbs R.R., Farmer R.G., Fiocchi C. Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease // *Gastroenterology.* – 1992. – Vol. 102. – No. 4 Pt 1. – p. 1242-51.
117. Kulkarni S., Micci M.A., Leser J., Shin C., Tang S.C., Fu Y.Y., Liu L., Li Q., Saha M., Li C., Enikolopov G., Becker L., Rakhilin N., Anderson M., Shen X., Dong X., Butte M.J., Song H., Southard-Smith E.M., Kapur R.P., Bogunovic M., Pasricha P.J. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 114. – No. 18. – p. E3709-E3718
118. Kunze W.A., Clerc N., Furness J.B., Gola M. The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation // *Physiol. (Lond.).* – 2000. – Vol. 526. – p. 375-385.
119. Kunze W.A., Furness J.B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility // *Annu Rev Physiol.* – 1999.– Vol. 61. – p. 117-42.
120. Kurashima Y., Amiya T., Nochi T., Fujisawa K., Haraguchi T., Iba H., Tsutsui H., Sato S., Nakajima S., Iijima H., Kubo M., Kunisawa J., Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors // *Nat Commun.* – 2012. – Vol. 3. – p. 1034.
121. Lakhan S.E., Kirchgessner A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease // *J Neuroinflammation.* – 2010. – Vol. 7. – p. 37
122. Laranjeira C.S.T. In Vivo Identification of Neural Stem Cells in the Enteric Nervous System. Doctoral thesis.– 2010. – UCL (University College, London).
123. Laranjeira C.S.T., Sandgren K., Kessaris N., Richardson W., Potocnik A., Vanden Berghe P., Pachnis V. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121. – No. 9. – p. 3412-24
124. Lin A., Lourenszen S., Stanzel R.D., Blennerhassett M.G. Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis // *Exp Neurol.* – 2005.– Vol. 191. – No. 2. – p. 337-43.
125. Linden D.R. Colitis is associated with a loss of intestinofugal neurons // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2012. – Vol.303.– No. 10.– p. G1096-104.
126. Linden D.R., Couvrette J.M., Ciolino A., McQuoid C., Blaszyk H., Sharkey K.A., Mawe G.M. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon // *Neurogastroenterol Motil.* – 2005. – Vol. 17. – No. 5. – p. 751-60.

127. Liu M.T., Kuan Y.H., Wang J., Hen R., Gershon M.D. 5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice // *J Neurosci.* – 2009 – Vol. 29. – No. 31.– p. 9683-99.
128. Lomax A.E.G., Fernández E., Sharkey K.A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation // *Neurogastroenterol Motil.* – 2005. –Vol. 17.– No. 1.– p. 4-15.
129. Lomax A.E.G., O'Hara J.R., Hyland N.P., Mawe G.M., Sharkey K.A. Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2007. –Vol. 292. – No. 2.- p. G482-91.
130. Lomax A.E.G., Sharkey K.A., Bertrand P.P., Low A.M., Bornstein J.C., Furness J.B. Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon // *Auton. Nerv. Syst.* – 1999. – Vol. 76. – p. 45-61.
131. Lossi L., Castagna C., Merighi A. Neuronal cell death: an overview of its different forms in central and peripheral neurons // *Methods Mol Biol.* – 2015.– Vol. 1254. – p. 1-18.
132. Lourenszen S., Wells R.W., Blennerhassett M.G. Differential responses of intrinsic and extrinsic innervation of smooth muscle cells in rat colitis // *Exp Neurol.* – 2005.– Vol. 195., – No. 2. – p. 497-507.
133. Makhlof G.M., Grider J.R. Makhlof G.M. Nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitters of the gut // *News Physiol. Sci.* – 1993. – Vol.8. – p. 196-199.
134. Matsumoto K., Lo M.W., Hosoya T., Tashima K., Takayama H., Murayama T., Horie S. Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice // *Lab Invest.* – 2012. – Vol. 92. – No. 5., – p. 769-82.
135. Mawe G.M. Colitis-induced neuroplasticity disrupts motility in the inflamed and post-inflamed colon // *J Clin Invest.* – 2015.– Vol. 125., – No. 3., – p.949-55.
136. Mawe G.M., Gershon M.D. Relationship of gallbladder ganglia to the enteric nervous system: structure, putative neurotransmitters and direct neural connections / *Nerves and the Gastrointestinal Tract* Singer M.V., Goebell H. (eds). // Kluwer Academic Publishers.– The Netherlands. –1989.– 840 p.
137. McConalogue K., Furness J.B. Gastrointestinal neurotransmitters // *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* – 1994. – V.8. – No 1. – p. 51-76.
138. McDonald S.A., Palmen M.J., Van Rees E.P., MacDonald T.T. Characterization of the mucosal cell-mediated immune response in IL-2 knockout mice before and after the onset of colitis // *Immunology.* – 1997. Vol. 91. – No. 1. – p. 73-80.
139. McRorie J., Krier J., Adams T. Morphology and projections of myenteric neurons to colonic fiber bundles of the cat // *Auton. Nerv. Syst.* – 1991. – Vol.32. – p. 205-216.
140. Mei F., Guo S., He Y.T., Zhu J., Zhou D.S., Niu J.Q., Wang H.Z., Tian Y.P. Apoptosis of interstitial cells of Cajal, smooth muscle cells, and enteric neurons induced by intestinal ischemia and reperfusion injury in adult guinea pigs // *Virchows Arch.* – 2009.– Vol. 454.– No 4.– p.401-9
141. Melgar S., Karlsson A., Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2005. – Vol. 288.– No. 6.– p. G1328-38

142. Mennigen R., Nolte K., Rijcken E., Utech M., Loeffler B., Senninger N., Bruewer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2009. – Vol. 296., No. 5. – p. G1140–9.
143. Miampamba M., Sharkey K.A. Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats // *Neurogastroenterol Motil.* – 1999. C Vol. 11. – No. 3. – p.193-206.
144. Mizuta Y., Isomoto H., Takahashi T. Impaired nitrergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium // *Gastroenterology.* – 2000. – Vol. 118. – No.4. – p.714-23.
145. Morampudi V., Bhinder G., Wu X., Dai C., Sham H.P., Vallance B.A., Jacobson K. DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat // *J Vis Exp.* – 2014. – No. 84. – p. e51297.
146. Morgan K.G., Angel F., Schmalz P.F. Intracellular electrical activity of muscularis mucosae of the dog stomach // *Am. Physiol.* – 1985. – Vol. 249. – p. G256-G263.
147. Moynes D. M. The role of interleukin-17a in inflammatory bowel disease-related neural plasticity / Degree of Master of Science Thesis, Queen’s University Kingston, Ontario, Canada, 2014.
148. Moynes D.M., Lucas G.H., Beyak M.J., Lomax A.E.G. Effects of inflammation on the innervation of the colon // *Toxicol Pathol.* – 2014. – Vol. 42., No. 1. – p. 111-7.
149. Murray C., Emmanuel A. Chapter 12. Colonic Disorders / *Pathophysiology of the enteric nervous system : a basis for understanding functional diseases.* 1st ed. Robin Spiller, David Grundy (eds.) // Wiley. – 2004. – 272 p.
150. Natali M.R., Miranda Neto M.H., Orsi A.M. Ultrastructural features of myenteric ganglia of adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) // *Anat Histol Embryol.* – 2000. – Vol. 29. – No. 6. – p. 393-7.
151. Neunlist M., Van Landeghem L., Mahé M.M., Derkinderen P., des Varannes S.B., Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2013. – Vol.10. – No.2. – p.90-100.
152. Niekerk van E.A., Tuszyński M.H., Lu P., Dulin J.N. Molecular and Cellular Mechanisms of Axonal Regeneration After Spinal Cord Injury // *Mol Cell Proteomics.* – 2016. – Vol. 15. – No. 2. – p. 394-408.
153. Nurgali K., Qu Z., Hunne B., Thacker M., Pontell L., Furness J.B. Morphological and functional changes in guinea-pig neurons projecting to the ileal mucosa at early stages after inflammatory damage // *J Physiol.* – 2011. – Vol. 589(Pt 2). – p.325-39.
154. Obermayr F., Hotta R., Enomoto H., Young H.M. Development and developmental disorders of the enteric nervous system // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2013. – Vol. 10. – No. 1. – p. 43-57.
155. Ochoa-Cortes F., Turco F., Linan-Rico A., Soghomonyan S., Whitaker E., Wehner S., Cuomo R., Christofi F.L. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases // *Inflamm Bowel Dis.* – 2016. – Vol. 22. – No. 2. – p. 433-449.
156. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora // *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* – 1985 – Vol. 82. – No. 5. – p. 1327-36.

157. Ohlsson B., Veress B., Lindgren S., Sundkvist G. Enteric ganglioneuritis and abnormal interstitial cells of Cajal: features of inflammatory bowel disease // *Inflamm Bowel Dis.* – 2007. – Vol. 13.– No. 6.– p. 721-6.
158. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice // *Gastroenterology* – 1990. – Vol.98.– No.3.– p. 694-702.
159. Olson E. Particle Shape Factors and Their Use in Image Analysis-Part 1: Theory // *Journal of GXP Compliance.* – 2011. – Vol. 15.– No. 3
160. Pan H., Gershon M.D. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine // *Neurosci.* – 2000. – Vol. 20.– p. 3295-3309.
161. Pavelka M., Roth J. *Functional Ultrastructure Atlas of Tissue Biology and Pathology* / Springer Verlag // Wien – 2005.–326 p.
162. Perše M., Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks // *J Biomed Biotechnol.* – 2012. – No. 2012. – p. 718617.
163. Pham D.L., Xu C., Prince J.L. Current methods in medical image segmentation // *Annu Rev Biomed Eng.*– 2000. – Vol.2.– p. 315-37.
164. Poli E., Lazzaretti M., Grandi D., Pozzoli C., Coruzzi G. Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis // *Neurochem Res.* – 2001. – Vol. 26.– No.8-9.– p. 1085-93.
165. Pompolo S., Furness J.B. Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine // *Neurocytol.* – 1988. – V. 17.– p. 771-782.
166. Pontell L., Castelucci P., Bagyánszki M., Jovic T., Thacker M., Nurgali K., Bron R., Furness J.B. Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation // *Virchows Arch.* – 2009. –Vol. 455.– No. 1.– p. 55-65
167. Poritz L.S., Garver K.I., Green C., Fitzpatrick L., Ruggiero F., Koltun W.A. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis // *J Surg Res.* – 2007. – Vol. 140.– No. 1.– p. 12-9.
168. Racalbuto A., Magro G., Lanteri R., Aliotta I., Santangelo M., Di Cataldo A. Idiopathic myenteric ganglionitis underlying acute 'dramatic' intestinal pseudoobstruction: report of an exceptional case // *Case Rep Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 2.– No. 3.– p. 461-8.
169. Rand M.J. Nitrenergic transmission: Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1992. – Vol. 19.– p. 147-169.
170. Rao M., Gershon M.D. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2016.– Vol. 13.– No. 9.– p. 517-528.
171. Renzi D., Pellegrini B., Tonelli F., Surrenti C., Calabro A. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol.157.– p. 1511-1522.

172. Riemann J.F., Schmidt H. Ultrastructural changes in the gut autonomic nervous system following laxative abuse and in other conditions // *Scand J Gastroenterol Suppl.* – 1982.– Vol. 71.– p. 111-24.
173. Robinson A.M., Rahman A.A., Miller S., Stavely R., Sakkal S., Nurgali K. The neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells are dose-dependent in TNBS colitis // *Stem Cell Res Ther.*– 2017.– Vol. 8.– No. 1.– p. 87.
174. Robinson A.M., Sakkal S., Park A., Jovanovska V., Payne N., Carbone S.E., Miller S., Bornstein J.C., Bernard C., Boyd R., Nurgali K. Mesenchymal stem cells and conditioned medium avert enteric neuropathy and colon dysfunction in guinea pig TNBS-induced colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2014.– Vol. 307.– No. 11.– p. 1115-29.
175. Ross M.H., Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology 7th Edition* // Wolters Kluwer. –2015, – Medical – 984 p.
176. Sanders K.M., Ward S.M. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function // *J Physiol.* – 2006 –Vol. 576(Pt 3).–p. 721-726.
177. Sanovic S., Lamb D.P., Blennerhassett M.G. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis // *Am J Pathol.* – 1999.–Vol. 155.– No. 4.– p. 1051-7.
178. Sarna S.K. Giant migrating contractions and their myoelectric correlates in the small intestine // *Am. J. Physiol.* – 1987. – Vol. 253.–p. 697-705.
179. Sarnelli G., De Giorgio R., Gentile F., Cali G., Grandone I., Rocco A., Cosenza V., Cuomo R., D'Argenio G. D. Myenteric neuronal loss in rats with experimental colitis: role of tissue transglutaminase-induced apoptosis // *Dig Liver Dis.* – 2009. – Vol. 41.– No. 3.– p. 185-93.
180. Schäfer K.H., Van Ginneken C., Copray S. Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system // *Anat Rec (Hoboken).*– 2009.– Vol. 292.– No. 12.– p. 1940-52.
181. Schäppi M. G., Smith V. V., Milla P. J., Lindley K. J. Eosinophilic myenteric ganglionitis is associated with functional intestinal obstruction // *Gut.* – 2003. – Vol. 52. – No. 5. – p. 752-755.
182. Scheiffele F., Fuss I.J. Induction of TNBS colitis in mice // *Curr Protoc Immunol.* – 2002.– Chapter 15:Unit 15.19.
183. Scheinin T., Butler D.M., Salway F., Scallan B., Feldmann M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis // *Clin Exp Immunol.*– 2003.– Vol. 133.–No. 1.– p. 38-43.
184. Sharkey K.A. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders // *J Clin Invest.*– 2015 – Vol. 125.– No. 3.– p. 918-25.
185. Sigalet D.L., Wallace L., De Heuval E., Sharkey K.A. The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation // *Neurogastroenterol Motil.* – 2010. –Vol. 22.– No. 12.– p. 1318-e350.
186. Silva A.T., Wardhaugh T., Dolatshad N.F., Jones S., Saffrey M.J. Neural progenitors from isolated postnatal rat myenteric ganglia: expansion as neurospheres and differentiation in vitro // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1218.– p. 47-53.

187. Smith T.K., Spencer N.J., Hennig G.W., Dickson E.J. Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons // *Neurogastroenterol Motil.* – 2007. – Vol. 19.– No.11.– p. 869-78.
188. Spencer N.J., Keating D.J. Chapter 11. Is There a Role for Endogenous 5-HT in Gastrointestinal Motility? How Recent Studies Have Changed Our Understanding / *The Enteric Nervous System: 30 Years Later (Advances in Experimental Medicine and Biology)*. Brierley S., Costa M. (eds.) // Springer.– 2016.– 250 p.
189. Spiller R. Chapter 15. Diarrhea-Predominant Bowel Disorders Following Inflammation and Infection / *Pathophysiology of the enteric nervous system : a basis for understanding functional diseases*. 1st ed. Robin Spiller, David Grundy (eds.) // Wiley. – 2004. – 272 p.
190. Stavelly R., Robinson A.M., Miller S., Boyd R., Sakkal S., Nurgali K. Human adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow attenuate enteric neuropathy in the guinea-pig model of acute colitis // *Stem Cell Res Ther.*– 2015. – Vol. 6.– p. 244.
191. Stead R.H., Dixon M.F., Bramwell N.H., Riddell R.H., Bienenstock J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa // *Gastroenterology* –1989.– Vol. 97.– p. 575-585.
192. Steinhoff M.M., Kodner I.J., DeSchryver–Kecskemeti K. Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural marker for Crohn's disease // *Mod Pathol.*– 1988.– Vol. 1.– No. 3.– p. 182-7.
193. Strobach R.S., Ross A.H., Markin R.S., Zetterman R.K., Linder J. Neural patterns in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical survey // *Mod Pathol.* – 1990.– Vol. 3.– No. 4.– p. 488-93.
194. Syntichaki P., Tavernarakisa N. Reviews Concepts Death by necrosis Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? // *EMBO Rep.* – 2002.– Vol. 3.– No. 7.– p. 604-609.
195. Szurszewski J.H. Physiology of prevertebral ganglia // Szurszewski J.H., Miller S.M. Johnson LR (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract* / Raven Press, New York. – 1994. – 2080 p.
196. Talapka P. Structural and molecular changes of the enteric nervous system in rats with crohn's disease / Phd thesis Ph. D. School in Biology, Department of Physiology, Anatomy and Neuroscience , The Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, Hungary, 2014
197. Tanapat P. *Neuronal Cell Markers* Princeton // *Mater. Methods* – 2013. – Vol.3.– p. 196.
198. Timmermans J.P., Adriaensen D., Cornelissen W., Scheuermann D.W. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1997. – Vol. 118a.– p. 331-340.
199. Timmermans J.P., Barbiers M., Scheuermann D.W., Stach W., Adriaensen D., De Groot W.C., Lasseel M.H.A. Occurrence, distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig // *Cell Tissue Res.* – 1993. – Vol. 272.– p. 49-58.
200. Timmermans J.P., Hens J., Adriaensen D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans // *Anat. Rec.* – 2001. – Vol.262.– p. 71-78.

201. Venkataramana S., Lourenssen S., Miller K.G., Blennerhassett M.G. Early inflammatory damage to intestinal neurons occurs via inducible nitric oxide synthase // *Neurobiol Dis.* – 2015. – Vol. 75. – p. 40-52.
202. Vermeulen W., De Man J.G., Pelckmans P.A., De Winter B.Y. Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – No. 4. – p. 1005-1020.
203. Villanacci V., Bassotti G., Nascimbeni R., Antonelli E., Cadei M., Fisogni S., Salerni B., Geboes K. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases // *Neurogastroenterol Motil.* – 2008. – Vol. 20. – No. 9. – p. 1009-16.
204. Wallace A.S., Burns A.J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract // *Cell Tissue Res.* – 2005. – Vol. 319. – p. 367-382.
205. Wang F.B., Powley T.L. Topographic inventories of vagal afferents in gastrointestinal muscle // *Comp. Neurol.* – 2000. – Vol. 421. – p. 302-324.
206. Wang Y., Qin Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death // *Apoptosis.* – 2010. – Vol. 15. – No. 11. – p. 1382-402.
207. Ward S.M., Beckett E.A.H. Wang X.Y., Baker F., Khoiyi M., Sanders K.M. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons // *Neurosci.* – 2000. – Vol. 20. – p. 1393-1403.
208. Watari N. Fine structure of nervous elements in the pancreas of some vertebrates // *Z. Zellforsch.* – 1968. – Vol. 85. – p. 291-314.
209. Winston J.H., Li Q., Sarna S.K. Paradoxical regulation of ChAT and nNOS expression in animal models of Crohn's colitis and ulcerative colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2013. – Vol. 305. – No.4. – p. G295-302.
210. Wood J.D. Enteric Nervous System: Neuropathic Gastrointestinal Motility. // *Dig Dis Sci.* – 2016. – Vol.61. – No.7. – p. 1803-16.
211. Wood J.D. Enteric Nervous System: The Brain–in–the–Gut (Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function / Morgan & Claypool Life Sciences. – 2011. – 170 p.
212. Xue L., Farrugia G., Miller S. M., Ferris C. D., Snyder S. H., Szurszewski J. H. Carbon monoxide and nitric oxide as co-neurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97. – p. 1851-1855.
213. Yeom Y., Kim Y. The Sasa quelpaertensis Leaf Extract Inhibits the Dextran Sulfate Sodium-induced Mouse Colitis Through Modulation of Antioxidant Enzyme Expression // *J Cancer Prev.* – 2015. – Vol. 20. – No.2. – p. 136-146.
214. Young H.M., Furness J.B. An ultra-structural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea-pig small intestine // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – Vol. 356. – p. 101-114.
215. Young H.M., Hearn C.J., Ciampoli D., Southwell B.R., Brunet J.F., Newgreen D.F. A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the

expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture // *Dev. Biol.* – 1998. – Vol. 202. – p. 67-84.

216. Yu Y.B., Li Y.Q. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier // *World J Gastroenterol.* – 2014.– Vol. 20,– No.32– p. 11273-11280.

217. Zagorodnyuk V., Maggi C.A. Pharmacological evidence for the existence of multiple P2 receptors in the circular muscle of guinea-pig colon // *Br. J. Pharmacol.* –1998. –Vol .123.– p. 122-128.

218. Zou Y. Protein Attractants and Repellants in Axonal Guidance // *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Neuroactive Proteins and Peptides*, Abel Lajtha, Ramon Lim (Eds.)/ Springer Science & Business.– 2006. – 681 p.