

УДК 611.345

^{1,2}Чумасов Е. И., ³Самедов В. Б., ¹Петрова Е. С., ¹Коржевский Д. Э.

**МАКРОФАГИ В ЭНТЕРАЛЬНОМ НЕРВНОМ СПЛЕТЕНИИ
И МЫШЕЧНОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МЕДЛЕННО-ТРАНЗИТНОМ ЗАПОРЕ
(ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,
Российская Федерация

²Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины,
Санкт-Петербург, Российская Федерация

³Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург,
Российская Федерация

Аннотация. Цель работы состояла в изучении макрофагов в ганглиозных и мышечных сплетениях стенки кишки больных хроническим медленно-транзитным запором (ХМТЗ), используя иммуногистохимические маркеры. Фрагменты сигмовидной и ободочной кишки, выделенные в результате оперативного вмешательства по поводу ХМТЗ (пять случаев, женщины в возрасте 37–40 лет), были получены на кафедре факультетской хирургии им. С. П. Федорова ВМедА имени С. М. Кирова. Для изучения симпатических нервных аппаратов использовали антитела к тирозингидроксилазе, макрофаги идентифицировали с помощью антител к белку CD68.

Основные результаты показали, что в стенке кишки при ХМТЗ в условиях нарушения симпатического звена иннервации ЭНС наблюдаются изменения в состоянии, морфологических особенностях и распределении макрофагов в ганглиозном сплетении и в мышечной оболочке толстой кишки. Подтверждаются предположения о значении миентеральных макрофагов в процессах нарушения иннервации стенки кишки при ХМТЗ. Предполагается, что CD68+ макрофаги не принимают непосредственного участия в процессах нейрофагии и уборке продуктов распада нервных структур в нейропиле ганглиев Ауэрбахова сплетения. Вероятнее всего, свои фагоцитарные функции CD68+ макрофаги выполняют по отношению к структурам нейро-мышечного терминального синаптического сплетения, состоящего из нервных волокон Ремака, относящихся к автономной нервной системе. Однако вопрос этот остается дискуссионным.

Ключевые слова: толстая кишка человека, макрофаги, тирозингидроксилаза, белок CD68, хронический медленно-транзитный запор, иммуногистохимия.

^{1,2}Chumasov E. I., ³Samedov V. B., ¹Petrova E. S., ¹Korzhevskii D. E.

MACROPHAGES IN ENTERAL NERVOUS PLEXUS AND COLON MUSCLE SHELL IN CHRONIC SLOW-TRANSIT CONSTIPATION (IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

¹*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

²*St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

³*S. M. Kirov Military medical academy, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. The aim of the work was to study macrophages in the ganglionic and muscular plexuses of the colon wall in patients with chronic slow-transit constipation using immunohistochemical markers. Fragments of the sigmoid and colon, isolated as a result of surgical intervention (five cases, women aged 37–40 years), were obtained at the Department of Faculty Surgery of S. M. Kirov Military Medical Academy. To study sympathetic nerve structures, antibodies to tyrosine hydroxylase were used, macrophages were identified using antibodies to the CD68 protein.

The main results showed that there are changes in the state, morphology and distribution of macrophages in the ganglionic plexus and in the muscles of the large intestine in chronic slow-transit constipation in violation of sympathetic innervation. The work confirmed the assumptions on the significance of myenteric macrophages in the processes of intestinal wall innervation disorders in chronic slow-transit constipation. It is assumed that CD68+ macrophages are not directly involved in the processes of neuronophagy in the neuropil of the ganglia of the Auerbach's plexus. Probably, CD68+ macrophages perform their phagocytic functions in relation to the structures of the neuromuscular terminal synaptic plexus, which consists of Remak nerve fibers belonging to the autonomic nervous system. However, this issue remains debatable.

Keywords: human colon, macrophages, tyrosine hydroxylase, CD68 protein, chronic slow-transit constipation, immunohistochemistry.

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительный процесс является важным патогенетическим фактором заболеваний кишечника. Это касается таких болезней, как болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника, неспецифический язвенный колит, хронический медленно-транзитный запор и др. [1–3]. Локальный воспалительный процесс нарушает сократительную активность кишечника, ингибирует тормозные нервные пути и может приводить к генерализованному нарушению моторики желудочно-кишечного тракта [4]. Показано, что макрофаги, находящиеся в мышечной оболочке кишки, являются (наряду с тучными клетками) ключевыми участниками этого воспалительного каскада. Известно, что слизистая оболочка, подслизистая основа и мышечная оболочка стенки кишки содержат несколько популяций резидентных фагоцитов и антиген-презентирующих клеток [5]. В норме большинство из них сосредоточены между продольным и циркулярным мышечными слоями на уровне миентерального ганглиозного сплетения [6,7] и в серозной оболочке кишечника. Недостаточно изучены морфофункциональ-

ные изменения макрофагов в стенке толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре. Ранее нами было показано, что при ХМТЗ на фоне воспаления в слизистой оболочке и в подслизистой основе наблюдаются нарушения иннервации толстого кишечника. Описаны дистрофические и тяжелые дегенеративные изменения нервных клеток в ганглиозных сплетениях ЭНС [2]. Наличие макрофагов, участвующих в нейродегенеративных процессах, происходящих при ХМТЗ в ганглиях Ауэрбахова и Мейснерова сплетений, а также их фенотипические признаки, остаются мало изученными. Целью настоящей работы явилось исследование макрофагов в ганглиозных и мышечных сплетениях стенки кишки больных ХМТЗ с использованием иммуногистохимических маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагменты сигмовидной кишки и ободочной кишки, выделенные в результате оперативного вмешательства по поводу ХМТЗ (пять случаев, женщины в возрасте 37–40 лет), были получены на кафедре факультетской хирургии им. С. П. Федорова ВМедА имени С. М. Кирова. Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [8]. После соответствующей гистологической обработки материал заливали в парафин. Иммуногистохимические (ИГХ) реакции проводили на парафиновых срезах толщиной 5 мкм. Для иммуноцитохимического выявления маркера симпатических нервных структур применяли поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания) к тирозингидроксилазе. Для идентификации макрофагов использовали моноклональные мышинные антитела (клон KP1) (Dako, Дания) к белку CD68. В качестве вторичных реагентов применяли реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Часть препаратов докрашивали толуидиновым синим по Нислю. Для осуществления негативного контроля ИГХ-реакций на часть срезов вместо первичных антител наносили их разбавитель (Dako, Дания; сейчас Agilent, США). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью ИГХ-метода выявления тирозингидроксилазы (ТН), селективно выявляющего катехоламинергические структуры, практически во всех случаях в ганглиях Ауэрбахова и Мейснерова сплетений наблюдаются четкие картины нейродегенеративных изменений проводниковых и терминальных аппаратов постганглионарных безмиелиновых симпатических нервов, которые приходят в кишечник извне и заканчиваются перичеселлюлярными синаптическими аппаратами на холинергических нейронах и их дендритах. На *рис. 1* четко видны патологические изменения нервных структур. Они выражаются в различной степени дегенерации постганглионарных безмиелиновых симпатических нервных волокон и их перичеселлюлярных нервных аппаратов, участвующих в иннервации перикарионов и дендритов холинергических нейронов. Хорошо просматриваются различной длины и формы, часто с сильно извитыми контурами, фрагменты проводников, а также располагающиеся очагово или рассеянно их терминальные структуры. Последние представлены скоплениями шарообразных, пластинчатых и гранулярных элементов, относящихся к перичеселлюлярным синаптическим ап-

паратам, многие из которых локализируются вокруг «клеток-теней». Судя по отсутствию в цитоплазме последних хроматофильной субстанции, они представляют собой погибшие нейроны. По нашему мнению, перечисленные элементы являются мумифицированными продуктами распада проводниковых терминальных отделов нервных волокон и синапсов. Морфологический анализ показал, что подобные очаги дегенерации или распада симпатических структур определяются в большей или меньшей степени во всех исследованных случаях у больных ХМТЗ. Описанные изменения нервных клеток сопровождаются развивающимся в ганглиях глиозом.

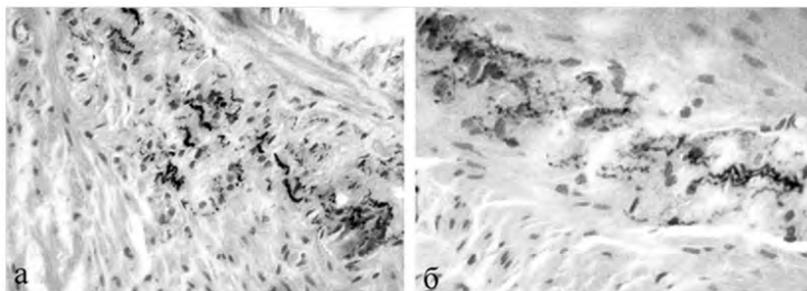


Рис. 1. Фрагменты ганглиозного миентерального нервного сплетения толстого отдела кишечника. Очаги распада симпатических нервных структур: а — ободочная (случай — I); б — нисходящая (случай — II). ИГХ-реакция на тирозингидроксилазу. Подкраска толуидиновым синим. Ув. 400 (а), 1000 (б)

Наряду с описанными нейродегенеративными изменениями (аганглиозом и глиозом) мы обратили внимание на отсутствие в ганглиозных сплетениях и в мышцах выраженных лейкоцитарных инфильтратов, характерных для слизистой оболочки и подслизистой основы при ХМТЗ и необходимых для утилизации продуктов распада нервных элементов. Для выяснения этого вопроса была использована ИГХ-реакция к белку CD68 — маркеру макрофагов. Выяснилось, что иммунореактивные к данному белку макрофаги в ганглиозных сплетениях и мышечных слоях располагаются диффузно или разреженно. Клетки имеют относительно небольшие размеры (от 7 до 15 мкм), овальную или округлую форму. Их цитоплазма и короткие отростки окрашены в черный цвет. Небольшие группы макрофагов (3–4 клетки) чаще встречаются вблизи ганглиев, некоторые прилегают к ганглиям, располагаясь на границе с соединительной тканью и гладкомышечными клетками, и только единичные — находятся внутри нейропиля. Таким образом, больше макрофагов локализуется вокруг ганглиев, чем внутри. Этот факт объясняется отсутствием внутри ганглиев ЭНС микрососудистого русла.

На иллюстрации видно, что большое число макрофагов сконцентрировано в области мышечных пучков, но не в ганглии Ауэрбахова сплетения (*рис. 2*). В мышечной ткани они приобретают сильно вытянутую форму и располагаются цепочками между пучками миоцитов. Некоторые из них настолько истончены, что возникает сходство или впечатление, что это фрагменты нервных волокон (*рис. 3*). Обращает на себя внимание, что они локализируются в интерстиции, в месте расположения «ремаковских волокон», которые, как известно, состоят

в основном из парасимпатических нервных волокон и участвуют в иннервации гладкомышечных клеток продольного и concentрического слоев мышц и поэтому с помощью ИГХ-реакции на ТН не выявляются. Возможно, они подверглись дегенерации. А может, этот факт связан с наличием в большинстве случаев при ХМТЗ выраженного отека в интерстиции мышечной ткани. Важно отметить, что в местах локализации макрофагов в интерстиции не удалось также выявить обменных капилляров. В то же время в других местах в продольном мышечном слое, как и в норме, встречаются петли капилляров.

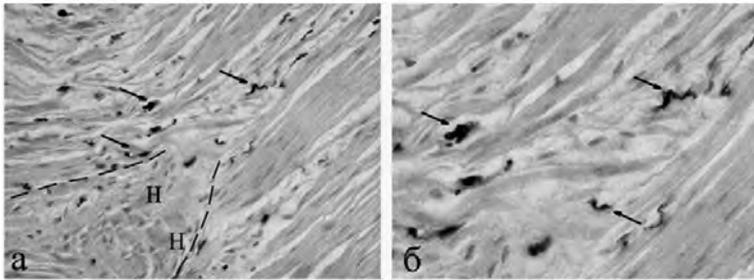


Рис. 2. Распределение макрофагов вокруг ганглия Ауэрбахова сплетения в местах выхода из него ремаковских тяжей в окружающие мышцы (в стенке ободочной кишки при ХМТЗ): а — общий вид; б — фрагмент; пунктиром обведены границы ганглия; Н — «клетки-тени» или патологически измененные нейроны; ↑↑ — макрофаги. ИГХ-реакция на CD68. Подкраска толуидиновым синим. Ув. 400 (а), 1000 (б)

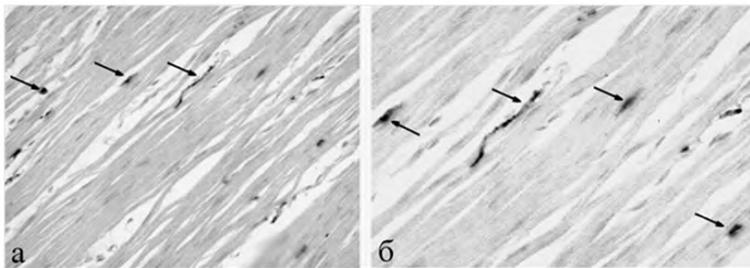


Рис. 3. Макрофаги в мышечном слое на фоне отечной ткани при ХМТЗ: а — общий вид; б — фрагмент. ↑↑ — макрофаги. ИГХ-реакция на CD68. Подкраска толуидиновым синим. Ув. 400 (а), 1000 (б)

Структурные особенности и функции миентеральных макрофагов и их взаимоотношения с нервными и гладкомышечными клетками мало изучены [3, 10]. Взаимодействие макрофагов с элементами ЭНС может быть вовлечено в патофизиологию различных заболеваний, в том числе ХМТЗ. Показано, что воспаление в слизистой оболочке приводит к функциональным изменениям симпатических нервных аппаратов. Есть данные о том, что развитие воспалительных инфильтратов в нервных сплетениях у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника и вырабатываемые миентеральными макрофагами факторы могут приводить к потере нейронов, однако точные механизмы этого процесса остаются неизвестными [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования с помощью иммуногистохимических маркеров изучены распределение, морфологические особенности и состояние макрофагов в ганглиозном сплетении и в мышечной оболочке толстой кишки при ХМТЗ в условиях нарушения симпатического звена иннервации ЭНС. Подтверждаются предположения о значении миентеральных макрофагов в процессах нарушения иннервации стенки кишки при ХМТЗ. Предполагается, что CD68+ макрофаги не принимают непосредственного участия в процессах нейрофагии и уборке продуктов распада нервных структур в нейропиле ганглиев Ауэрбахова сплетения. Вероятнее всего, свои фагоцитарные функции CD68+ макрофаги выполняют по отношению к структурам нейро-мышечного терминального синаптического сплетения, состоящего из нервных волокон Ремака, относящихся к автономной нервной системе. Однако вопрос этот остается дискуссионным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майстренко Н. А., Манихас Г. М., Сазонов А. А. и др. Влияние возрастного фактора и иммунофенотипа опухоли на эффективность циторедуктивных операций при метастатическом раке толстой кишки // Вопросы онкологии. 2019. Т. 65. № 6. С. 855–862.
2. Чумасов Е. И., Майстренко Н. А., Ромашенко П. Н. и др. Иммуногистохимическое исследование симпатической иннервации толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022. № 11. С. 191–197.
3. Becker L., Nguyen L., Gill J. Age-dependent shift in macrophage polarisation causes inflammation-mediated degeneration of enteric nervous system. *Gut*. 2018; 5:827–836.
4. Boeckxstaens G. E., de Jonge W. J. Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. *Gut*. 2009; 58(9):1300–1111.
5. Cruz-Morales E., Meza-Pérez S., Calderón-Amador J. et al. Neonate antigen presenting cells within murine intestinal muscular layer. *Immunol Invest*. 2012; 41(1):104–116.
6. Mikkelsen H. B., Garbarsch C., Trantum-Jensen J., et al. Macrophages in the small intestinal muscularis externa of embryos, newborn and adult germ-free mice. *J Mol Histol*. 2004; 4:377–387.
7. Mikkelsen H. B., Larsen J. O., Hadberg H. The macrophage system in the intestinal muscularis externa during inflammation: an immunohistochemical and quantitative study of osteopetrotic mice. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130:363–373.
8. Grigorev I. P., Korzhevskii D. E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2018; 10:156–165.
9. Brierley S. M., Linden D. R. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11(10):611–627.
10. Ельчанинов А. В., Фатхудинов Т. Х. Макрофаги: монография. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 202 с.