

© Л. С. Агаджанова, Т. А. Румянцева, 2014
УДК 611.33.018:599.323.4

Л. С. Агаджанова и Т. А. Румянцева

ГИСТОТОПОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПЕЙСМЕКЕРОВ (КЛЕТОК КАХАЛЯ) И NADPH-d-ПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ В СТЕНКЕ ЖЕЛУДКА У КРЫС

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), Ярославская государственная медицинская академия

Для установления особенностей распределения интерстициальных клеток Кахалы (ИКК) в стенке желудка взрослых крыс линии Вистар использован иммуногистохимический метод выявления c-kit (CD117). Наибольшая относительная плотность расположения ИКК отмечена по всему периметру пилорического и в дорсальной стенке пищевого отдела желудка. Наименьшая плотность расположения ИКК характерна для кардиального отдела. Дорсальная и вентральная стенки тела желудка имеют промежуточные показатели плотности расположения ИКК. Установлена значимая корреляция между плотностью сетей ИКК и плотностью расположения NADPH-d-позитивных нейронов. Высказано предположение о непосредственном участии NO-позитивной части нервного аппарата в регуляции активности пейсмекеров желудка.

Ключевые слова: желудок, интерстициальные клетки Кахалы, c-kit, NADPH-d-позитивные нейроны, перистальтика

Интерстициальные клетки Кахалы (ИКК) формируют в стенках полых органов и сосудов сплетения разной плотности и архитектоники, являясь организаторами перистальтики и участвуя в поддержании тонуса посредством воздействия на гладкие миоциты (ГМ). ИКК обнаружены по ходу всего пищеварительного канала от пищевода до прямой кишки. Данные исследований позволяют предполагать наличие трех основных функций у ИКК: они могут играть важную роль пейсмекера, поскольку генерируют медленные волны деполяризации гладкой мышцы; облегчать активное распространение электрических явлений и быть промежуточным звеном нейротрансмиссии [6, 16]. В качестве медиаторов, участвующих в передаче нервных влияний через ИКК на ГМ, может выступать целая группа веществ, оказывающих стимулирующее или тормозящее действие на перистальтику. На ИКК выявляются возбуждающие холинергические и тормозящие нитроксидагические (NO-ергические) контакты [8, 13]. Более того, доказана относительная автономность сетей ИКК в продольном и циркулярном мышечных слоях трубчатых органов, позволяющая модулировать изолированную медленно- и быстроволновую сократительную активность кишки. С. А. Cobine и соавт. [8] обнаружили избирательность распределения симпатических и NO-ергических нервов в различных слоях внутреннего сфинктера прямой кишки у обезьян. К. Nakajima и соавт. [14] подчеркивали, что в нейронах ганглиев пищевари-

тельного тракта у морской свинки активность холин-ацетилтрансферазы не сочеталась с активностью NADPH-диафоразы (NADPH-d), что это две независимые субпопуляции нейронов [14].

NO является уникальным эндогенным фактором, регулирующим тонус гладкой мышечной ткани, причем эффект осуществляется путем диффузии. NADPH-d служит источником электронов для простетической группы NO-синтазы и рассматривается как её кофермент, по активности которого можно судить об активности самой синтазы.

NO-синтезирующие нейроны широко распространены в мышечном и подслизистом нервных сплетениях полых органов. NADPH-d-позитивные нейроны выявлены в стенке глотки [1], желудка и двенадцатиперстной кишки у крыс [5], прямой кишки — у крыс и кроликов [6], толстой кишки — у свиньи [7].

Желудок является органом с выраженными видовыми особенностями и очень сложной организацией перистальтики. Понимание механизмов организации и регуляторных влияний на его двигательную активность невозможно без расширения представлений об особенностях сетей ИКК.

Многочисленные электрофизиологические данные указывают на разные участки стенки желудка как на зоны «водителей ритма» [2] и даже на возможность появления нового пейсмекера после удаления участка желудка или кишечника [4]. Анализ данных литературы [16] показы-

Сведения об авторах:

Агаджанова Лилия Семеновна (e-mail: lili2573@mail.ru), Румянцева Татьяна Анатольевна (e-mail: rum-yar@mail.ru), кафедра анатомии человека, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

вает существование взаимосвязи в организации перистальтики желудка между ИКК и NADPH-d-позитивными нейронами, но данные о количественной корреляции между ними на органном уровне отсутствуют.

Цель настоящего исследования — выявление топографических особенностей относительной плотности расположения ИКК и NADPH-d-позитивных нейронов в желудке у крысы и корреляции между этими показателями.

Материал и методы. Работа выполнена на 25 белых крысах-самцах линии Вистар массой 250 г. При взятии материала соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Исследованы вентральная и дорсальная стенки пищевода, кардиального, пилорического и фундального (тело) отделов желудка, которые определяли по их анатомическому описанию [3].

Иммуногистохимическое исследование ИКК проводили у 10 животных на параллельных криостатных срезах толщиной 40 мкм с использованием маркера c-kit (CD117) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США). Используя люминесцентный микроскоп Микромед 3 ЛЮМ (Микромед, Россия) с цифровой камерой MYSCOPE 500M (Webbers, Китай) делали по 10 микрофотографий каждого участка желудка у каждой крысы (об.10, ок.10), на которых с помощью программы ImageJ оценивали плотность распределения иммунопозитивных клеток путем наложения сетки с 412 равноудаленными точками и подсчитывали количество этих точек (единиц), приходящееся на позитивные клетки.

NADPH-d выявляли по методу В.Т.Норе и соавт. [10]. У 15 крыс на срезах различных отделов желудка подсчитывали количество интрамуральных ганглиев с NADPH-d-позитивными нейронами на площади среза вентральной и дорсальной стенки желудка, ограниченной полем зрения ($n=20$) светового микроскопа Optitech (Китай) при об.10, ок.10, и определяли среднее количество NADPH-d-позитивных нейронов, приходящееся на один ганглий.

Для обработки изображения и получения цифровых данных использовали программы ImageJ и Microsoft Office Excel. Оценку значимости различий проводили по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Иммунопозитивные ИКК были выявлены в мышечной оболочке всех исследованных отделов желудка. Они располагались преимущественно продольно по отношению к направлению вытянутости ГМ, в некоторых участках отмечались зоны их сгущения (рис. 1).

В пищеводном отделе желудка, расположенном слева от места впадения пищевода, плотность позитивных сплетений колебалась от 16 до 42 ед., составляя $23,0 \pm 1,2$ ед. в вентральной стенке и $25,7 \pm 1,5$ ед. в дорсальной стенке ($P < 0,05$). В кардиальном отделе плотность сплетения ИКК колебалась от 14 до 21 ед., в вентральной и дорсальной стенках и в среднем достигала $18,5 \pm 0,9$ и $18,5 \pm 1,0$ ед. соответственно.

В фундальном отделе (тело желудка) в вентральной и дорсальной стенках плотность расположения ИКК изменялась от 14 до 24 ед., при этом средние значения значимо не различались: $22,0 \pm 1,4$, $23,0 \pm 1,2$ и $22,5 \pm 1,7$ ед. ($P > 0,05$). В пилорическом отделе плотность сплетений в разных полях зрения колебалась от 16 до 28 ед., составляя в среднем $25,8 \pm 1,3$ ед. в вентральной и $24,5 \pm 1,3$ ед. в дорсальной стенке ($P > 0,05$).

Таким образом, наибольшая плотность расположения ИКК отмечена в двух зонах стенки желудка — по всему периметру пилорического отдела и в дорсальной стенке пищевода. Наименьшая плотность расположения ИКК характерна для кардиального отдела. Дорсальная и вентральная стенки тела желудка имели промежуточные показатели плотности расположения иммунопозитивных клеток.

В интрамуральных ганглиях желудка обнаружены NADPH-d-позитивные нейроны, количество которых колебалось от 2 до 15. Конечный продукт реакции равномерно распределялся в цитоплазме

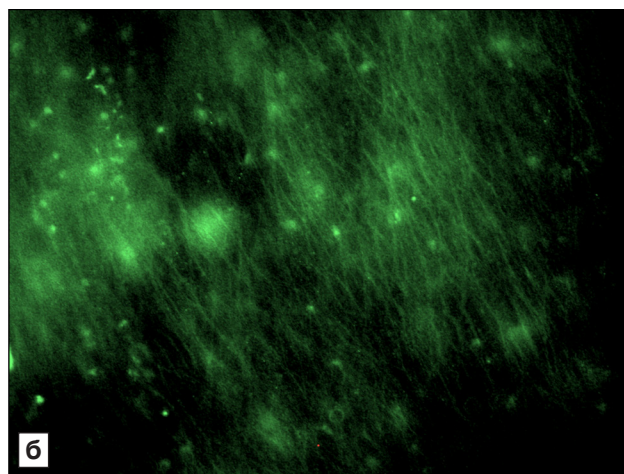
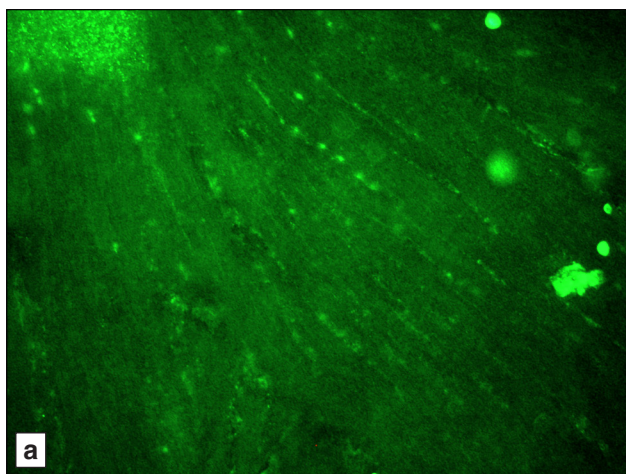


Рис. 1. Интерстициальные клетки Кахаля в пилорическом (а) и пищеводном (б) отделах желудка крысы. Реакция на c-kit. Об.40, ок.10

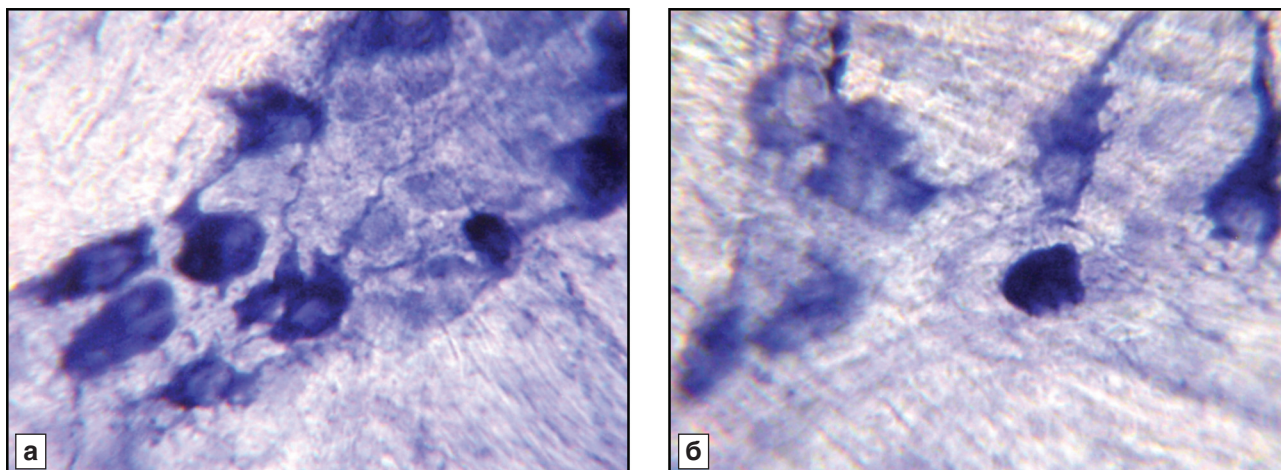


Рис. 2. NADPH-d-позитивные нейроны с разной степенью активности фермента в интрамуральных ганглиях пилорического (а) и пищеводного (б) отделов желудка крысы.

Метод Хоупа. Об.40, ок.10

нейронов, плотность его распределения варьировала: встречались клетки от бледно-голубого до черного цвета (рис. 2).

Наименьшее количество NADPH-d-позитивных нейронов содержалось в ганглиях вентральной и дорсальной стенок кардиального отдела желудка: на стандартной площади среза оно не превышало $7,0 \pm 1,2$ и $5,0 \pm 2,7$ соответственно, при суммарном содержании нейронов от 30 ± 5 до 56 ± 5 . Наибольшее количество ганглиев и иммунопозитивных нейронов отмечено в дорсальной стенке пилорического отдела ($14,0 \pm 2,9$ ганглиев и 112 ± 10

клеток). Эти показатели на стандартной площади среза стенки фундального отдела желудка имеют промежуточное значение (рис. 3).

Выявлена положительная корреляция средней плотности расположения ИКК и среднего количества NADPH-d-позитивных нейронов в ганглиях на стандартной площади ($r=0,71$).

Обсуждение полученных данных. Полученные нами данные о плотности сетей ИКК показывают, что различия между отделами желудка достигают 43%. Зоны с повышенной плотностью расположения ИКК имеют наибольшую толщину мышечной оболочки. Анализ литературы показал, что локализация пейсмекеров в стенке пилорического отдела электрофизиологически доказана у крысы, морской свинки, кошки и человека [9, 11, 12]. Согласно нашим данным, именно эта зона характеризуется высокой плотностью расположения ИКК. Наличие второй пейсмекерной зоны описано рядом авторов [15], но ее локализацию определяют по-разному — на большой кривизне, в дне желудка, кардиальном отделе (используя названия отделов желудка человека). Полученные нами результаты позволяют утверждать, что у крысы она локализована в задней стенке пищеводного отдела желудка.

Стенка пилорического отдела желудка при высокой плотности расположения ИКК отличается и значимо высокой плотностью NADPH-d-позитивных нейронов в интрамуральных сплетениях, что указывает на непосредственное участие NO-позитивной части нервного аппарата желудка в регуляции перистальтики этой зоны. В то же время, вторая зона повышенной плотности сетей ИКК — задняя стенка пищеводного отдела желудка

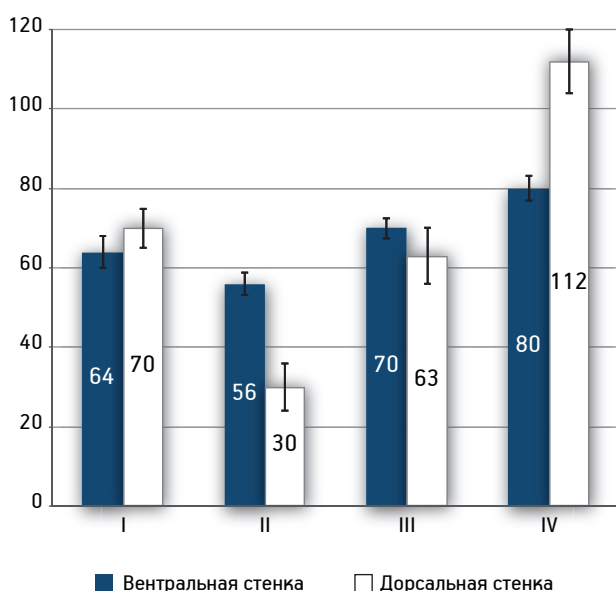


Рис. 3. Количество NADPH-d-позитивных нейронов в ганглиях различных отделов желудка крысы.

По оси абсцисс — отделы желудка: I — пищеводный; II — кардиальный; III — фундальный; IV — пилорический; по оси ординат — количество NADPH-d-позитивных нейронов на стандартной площади среза. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

ка не является зоной преимущественной локализации NADPH-d-позитивных нейронов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанова Л.С. Изменения NADPH-диафороза-позитивных нейронов ганглиев гортаноглотки при химической деафферентации. Морфология, 2006, т. 130, вып. 5, с. 23–24.
2. Биряльцев В.Н., Шаймарданов Р.Ш., Саетгараев А.К. и др. Электрогастроэнтерография в диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта. Казанск. мед. журн., 2002, № 2, с. 94–96.
3. Ноздрачев А.Д. и Поляков Е.Л. Анатомия крысы. СПб., Лань, 2001.
4. Оноприев В.В. Патогенез моторно-эвакуаторных нарушений и механизмы компенсации при хирургической коррекции стеноза двенадцатиперстной кишки (эксперим.-клин. исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2004.
5. Румянцева Т.А. Влияние химической денервации на нейроны экстра- и интрамуральных ганглиев в постнатальном онтогенезе белой крысы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2002.
6. Фоканова О.А. Возрастные преобразования центров иннервации прямой кишки в норме и в условиях химической десимпатизации и деафферентации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ярославль, 2006.
7. Barbiers M., Timmermans J.P., Adriansen D. et al. Projections of neurochemically specified neurons in the porcine colon. Histochem. Cell Biol., 1995, v. 103, № 2, p. 115–126.
8. Cobine C.A., Hennig G.W., Bayguinov Y.R. et al. Interstitial cells of Cajal in the cynomolgus monkey rectoanal region and their relationship to sympathetic and nitrergic nerves. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., 2010, v. 298, № 5, p. 643–656.
9. Edwards F.R. and Hirst G.D. An electrical description of the generation of slow waves in the antrum of the guinea-pig. J. Physiol., 2005, v. 564 (Pt. 1), p. 213–232.
10. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M. and Vincent S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Neurobiology, 1991, v. 88, p. 2811–2814.
11. Horiguchi K., Keef K.D. and Ward S.M. Distribution of interstitial cells of Cajal in tunica muscularis of the canine rectoanal region. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2003, v. 284, p. G756–G767.
12. Kito Y. The functional role of intramuscular interstitial cells of Cajal in the stomach. J. Smooth Muscle Res., 2011, v. 47, № 2, p. 47–53.
13. Kuramoto H., Kadowaki M. and Yoshida N. Morphological demonstration of a vagal inhibitory pathway to the lower esophageal sphincter via nitrergic neurons in the rat esophagus. Neurogastroenterol. Motil., 2013, v. 25, № 7, p. 485–494.
14. Nakajima K., Tooyama I., Yasuhara O. et al. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. J. Chem. Neuroanat., 2000, v. 18, № 1–2, p. 31–40.
15. Nishizaki K., Nakao K., Ishii H. et al. Induction of neuronal nitric oxide synthase by sympathetic denervation is mediated via alpha 2-adrenoceptors in the jejunal myenteric plexus. Brain Res., 2003, v. 965, № 1–2, p. 121–129.
16. Ward S.M. and Sanders K.M. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. J. Physiol., 2006, v. 576 (Pt. 3), p. 675–682.

Поступила в редакцию 21.05.2014

Получена после доработки 22.07.2014

HISTOTOPOGRAPHIC PECULIARITIES OF THE DISTRIBUTION OF INTERSTITIAL PACEMAKER CELLS (CAJAL CELLS) AND NADPH-D-POSITIVE NEURONS IN THE WALL OF THE STOMACH IN RATS

L.S.Agazhanova and T.A.Rumyantseva

To detect the peculiarities of the distribution of interstitial cells of Cajal (ICC) in the wall of the stomach of adult Wistar rats, immunohistochemical method for the demonstration of c-kit (CD117) was used. The greatest relative density of the ICC was found around the perimeter of the pyloric region and in the dorsal wall of the esophageal region of the stomach. The lowest density of ICC was characteristic of the cardia. Dorsal and ventral walls of the gastric corpus had the intermediate indices of ICC density. A significant correlation between the density of ICC networks and the density of NADPH-d-positive neurons was established. The direct participation of NO-positive part of the nervous apparatus in the regulation of gastric pacemaker activity is suggested.

Key words: *gastric interstitial cells of Cajal, c-kit, NADPH-d-positive neurons, peristalsis*

Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical Academy