

© Коллектив авторов, 2006
УДК 611.892:611.345:636.8

А.А. Дорофеева¹, С.С. Пантелеев¹, Л.А. Маркова², Е.Б. Плужниченко¹, **В.А. Багаев**¹ и
Ф.Н. Макаров²

ТОПИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НЕЙРОНОВ СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ, ИННЕРВИРУЮЩИХ ТОЛСТУЮ КИШКУ

¹ Лаборатории кортико-висцеральной физиологии (зав. — проф. **В.А.Багаев**) и ² нейроморфологии (зав. — д-р мед наук Ф.Н.Макаров) Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург

Исследована локализация чувствительных нейронов крестцовых спинномозговых ганглиев (КСГ), иннервирующих толстую кишку. Наркотизированным уретаном кошкам под серозную оболочку восходящей и нисходящей ободочной кишки, а также прямой кишки вводили раствор пероксидазы хрена. Через 48 ч животных повторно наркотизировали, транскардиально перфузировали, и изготавливали срезы КСГ, которые затем обрабатывали по методике М.Мезулам. Показано, что все исследованные отделы кишки получают афферентную иннервацию от КСГ S_I, S_{II} и S_{III}. Максимальное количество меченых клеток наблюдалось в ганглии S_{II}. Установлено, что выраженность чувствительной иннервации толстой кишки возрастает по ее длине в краниокаудальном направлении.

Ключевые слова: толстая кишка, чувствительная иннервация, крестцовый спинномозговой ганглий, пероксидаза хрена.

Особенности иннервации волокнами блуждающего нерва краниальных отделов пищеварительного тракта, включая желудок и тонкую кишку, исследованы достаточно подробно [1–3]. В меньшей степени изучена афферентная иннервация каудальных отделов пищеварительного тракта, в частности, топическая организация чувствительных псевдоуниполярных нейронов, тела которых располагаются в крестцовых спинномозговых ганглиях (КСГ), а периферические их отростки входят в состав афферентных волокон тазового нерва и образуют рецепторные структуры в разных отделах толстой кишки. Организация афферентного представительства толстой кишки в КСГ исследована недостаточно, так как в большинстве работ, посвященных этому вопросу, применялась аппликация раствора ретроградного нейронального маркера на центральный отрезок тазового нерва [9]. Тазовый нерв является основным коллектором интероцептивной информации, поступающей в крестцовый отдел спинного мозга от рецепторов толстой кишки и органов малого таза. Вместе с тем, вопрос о топической организации нейронов КСГ имеет существенное значение как для понимания общих принципов реализации висцеральных рефлексов толстой кишки, так и в клиническом аспекте, для восстановления нарушений моторной и эвакуаторной ее функций после травматических повреждений каудальных отделов спинного мозга у человека [10]. Поэтому целью настоящей работы было исследование локализации чувствительных нейронов КСГ, осуществляющих афферентную иннервацию толстой кишки кошки.

Материал и методы. Работа выполнена на 29 наркотизированных уретаном (1,3–1,5 г/кг) взрослых кошек массой 2–4 кг. В качестве маркера использовали пероксидазу хрена (HRP VI, Sigma, RZ>3,0). Раствор маркера (50–100 мкл, 50%) вводили под серозную оболочку восходящей (n=4) и нисходящей (n=18) ободочной кишки, а также прямой кишки (n=3). Через 48 ч животных повторно наркотизировали и производили транскардиальную перфузию изотоническим раствором, а затем фиксирующей смесью 1% раствора параформальдегида и 1,25% раствора глутаральдегида на фосфатном буфере (pH 7,4). После окончания перфузии КСГ, соответствующие сегментам S_I, S_{II} и S_{III}, помещали на 12 ч в 30% раствор сахарозы при температуре 4 °С. На замораживающем микротоме изготавливали продольные срезы ганглиев толщиной 50 мкм, которые обрабатывали по модифицированной методике М.-М.Мезулам [12]. Изображения срезов (об. 20, ок. 8) оцифровывали с помощью светового микроскопа JENAMED 2 (Германия) и цифровой камеры Minolta G 400 (Konica, Япония) с последующим сохранением в памяти компьютера. С помощью программы анализа изображений Image J (NIH, США) на каждом втором срезе определяли количество и площади сечения меченых нейронов с четко очерченными границами и с хорошо видимым ядром. Построение гистограмм распределения меченых клеток в ганглиях по количеству и площадям сечений, а также статистическую обработку результатов производили с использованием программного пакета Origin 7,5 (OriginLab Corp, США). Для оценки значимости различий средних использовали критерий Стьюдента.

Результаты исследования. После введения раствора маркера в стенку восходящей ободочной кишки немногочисленные меченые клетки различного размера преимущественно овальной формы были выявлены билатерально только в КСГ S_{II}–S_{III} (62 и 38% от общего числа меченых клеток, соответственно). В ганглиях S_I меченых нейронов не было обнаружено (рис. 1, а).

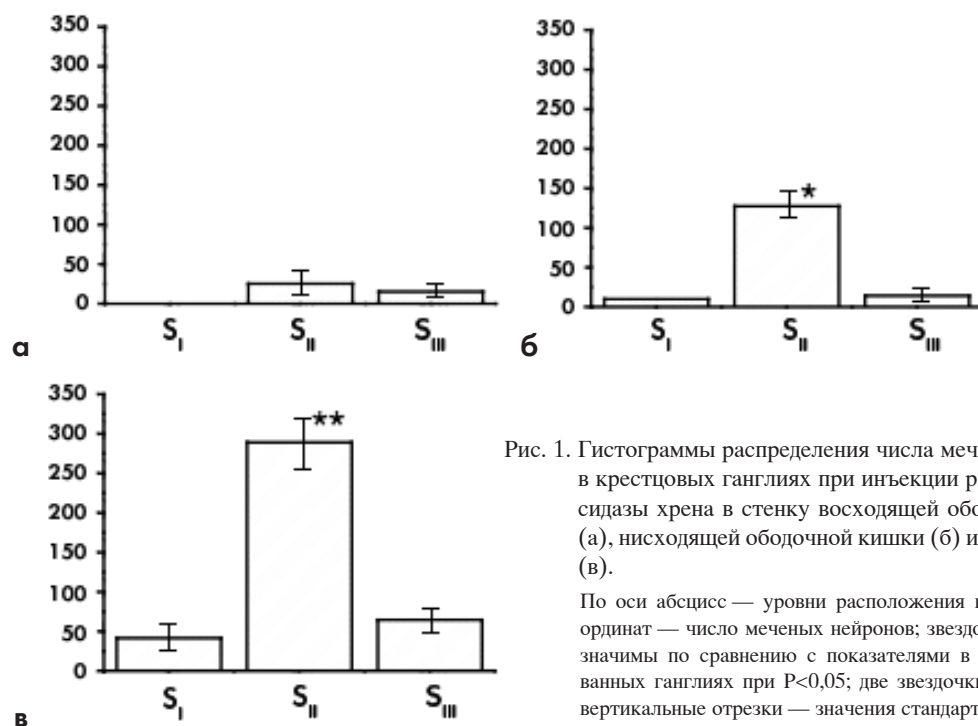


Рис. 1. Гистограммы распределения числа меченых нейронов в крестцовых ганглиях при инъекции раствора пероксидазы хрена в стенку восходящей ободочной кишки (а), нисходящей ободочной кишки (б) и прямой кишки (в).

По оси абсцисс — уровни расположения ганглиев; по оси ординат — число меченых нейронов; звездочка — различия значимы по сравнению с показателями в других исследованных ганглиях при $P < 0,05$; две звездочки — при $P < 0,01$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

После инъекций маркера в стенку нисходящей ободочной кишки меченые клетки располагались билатерально во всех изученных ганглиях, однако большинство чувствительных меченых нейронов, обеспечивающих афферентную иннервацию нисходящей ободочной кишки, были обнаружены в ганглии S_{II} (84% от общего числа меченых клеток). Значительно меньше меченых клеток было найдено в КСГ S_I и S_{III} (7 и 9% соответственно) (см. рис. 1, б).

Сходная картина распределения меченых клеток в ганглиях S_I , S_{II} и S_{III} наблюдалась и при инъекциях пероксидазы хрена в стенку прямой кишки. В этом случае максимальное количество меченых клеток также обнаружено в ганглии S_{II} (73% от общего числа меченых клеток). Однако меченых нейронов в ганглиях S_I и S_{III} было больше, чем при инъекциях маркера в стенку нисходящей ободочной кишки (11 и 16% соответственно) (см. рис. 1, в). Значимой билатеральной асимметрии в распределении меченых нейронов обнаружено не было.

Анализ распределения меченых нейронов по площадям их сечения на срезах КСГ S_I , S_{II} и S_{III} показал, что нейроны, осуществляющие афферентную иннервацию толстой кишки, представляют собой клетки преимущественно круглой или овальной формы, расположенные в основном на периферии ганглия. Тела клеток овальной формы были ориентированы в направлении продольной оси ганглия (рис. 2). Средняя площадь сечения

меченых нейронов изменялась в зависимости от сегментарного уровня ганглия и от иннервируемого участка толстой кишки. Так, при введении маркера в стенку восходящей ободочной кишки меченые клетки представляли собой относительно однородную популяцию и имели среднюю площадь сечения $912 \pm 44 \text{ мкм}^2$ и $894 \pm 50 \text{ мкм}^2$ в ганглиях S_{II} и S_{III} соответственно. Средняя площадь сечения чувствительных нейронов, иннервирующих нисходящую ободочную кишку, составляла $591 \pm 29 \text{ мкм}^2$, $694 \pm 10 \text{ мкм}^2$ и $639 \pm 26 \text{ мкм}^2$ в ганглиях S_I , S_{II} и S_{III} соответственно. При этом средние размеры нейронов, локализованных в ганглии S_{II} , значительно отличались от средних размеров нейронов в ганглиях S_I и S_{III} . При введении маркера в прямую кишку средняя площадь сечения меченых нейронов составляла $477 \pm 25 \text{ мкм}^2$, $770 \pm 14 \text{ мкм}^2$ и $578 \pm 27 \text{ мкм}^2$ в ганглиях S_I , S_{II} и S_{III} соответственно. При этом, средние размеры меченых клеток в ганглии S_{II} и S_{III} были также существенно больше, чем в ганглии S_I .

Обсуждение полученных данных. Рефлекторная регуляция деятельности толстой кишки обеспечивается интрамуральными и экстрамуральными нервными механизмами [4]. Первые включают в себя самый сложный нервный аппарат, который локализован в сплетениях кишечной стенки и обеспечивает локальные рефлексы толстой кишки (перистальтика, антиперистальтика и др.). Вторые обеспечивают

координацию функций разных участков кишки и их интеграцию в ее целостную деятельность, начиная с поступления химуса через илеоцекальный сфинктер и кончая выведением каловых масс. Предполагается, что эти рефлексy реализуются с участием рецепторов различной модальности, расположенных в кишечной стенке, афферентных волокон тазовых нервов, чувствительных нейронов КСГ, а также парасимпатических нейронов боковых рогов крестцовых сегментов спинного мозга, аксоны которых входят в состав эфферентных волокон тазового нерва [7]. Настоящая работа посвящена исследованию афферентной иннервации восходящей, нисходящей ободочной и прямой кишки нейронами КСГ, соответствующих сегментам S_I , S_{II} и S_{III} спинного мозга кошки.

Полученные нами данные свидетельствуют, что все исследованные участки толстой кишки иннервируются афферентными нейронами КСГ. Это в целом согласуется с результатами, полученными другими исследователями на крысах и кошках [9, 13]. Вместе с тем, нами обнаружено, что сегментарное распределение чувствительных нейронов в КСГ специфично для каждого отдела толстой кишки. Так, восходящая ободочная кишка в наименьшей степени иннервируется чувствительными нейронами КСГ, в сравнении с каудальными ее отделами, причем только клетками ганглиев S_{II} и S_{III} . Чувствительные нейроны, иннервирующие нисходящую ободочную кишку, представлены во всех КСГ. При этом их максимальное количество обнаружено в ганглии, соответствующем сегменту S_{II} . Прямая кишка характеризуется наиболее выраженной чувствительной иннервацией, осуществляемой нейронами КСГ, причем, как и в случае нисходящей ободочной кишки, прямая кишка в наибольшей степени иннервируется нейронами ганглия S_{II} .

Таким образом, полученные нами данные показывают, что степень выраженности иннервации толстой кишки нейронами КСГ увеличивается в каудальном направлении. При этом максимальное число чувствительных нейронов наблюдается в ганглии S_{II} . Это находится в соответствии с данными о том, что у кошек наибольшее количество меченых парасимпатических клеток, иннервирующих каудальные отделы толстой кишки, расположено в сегментах S_{II} и S_{III} спинного мозга [14]. Более того, электрическая стимуляция вентрального корешка спинномозгового нерва, соответствующего сегменту S_{II} , и микроstimуляция нейронов парасимпатического ядра этого сегмента спинного мозга вызывают наиболее выраженные моторные реакции каудального отдела толстой



Рис. 2. Крестцовый ганглий S_{II} кошки с мечеными пероксидазой хрена клетками после введения раствора маркера в стенку прямой кишки. Метод М.М. Mesulam.

кишки кошки [17]. Очевидно, можно предположить, что основной афферентный вход к крестцовым парасимпатическим нейронам от каудальных отделов толстой кишки, в нашем случае нисходящей ободочной и прямой, обеспечивается чувствительными нейронами, расположенными в крестцовом ганглии, соответствующем сегменту S_{II} . Таким образом, у кошек в этом сегменте спинного мозга, по-видимому, имеется структурная основа для реализации спинальных рефлексов каудальных отделов толстой кишки. Что касается относительно бедного представительства восходящей ободочной кишки в КСГ, то одним из объяснений этого может быть более выраженная, по сравнению с каудальными участками, чувствительная и парасимпатическая иннервация этого отдела нейронами продолговатого мозга, показанная у крыс и кошек [5, 14], и нейронами ганглиев поясничных сегментов спинного мозга [15].

Проведенный нами морфометрический анализ размеров (оценка площади сечения клеток на срезах) чувствительных нейронов КСГ S_I , S_{II} и S_{III} показал, что афферентные нейроны, иннервирующие краниальный отдел толстой кишки — восходящую ободочную кишку, представляют собой однородную по размерам группу относительно больших клеток. Нейроны КСГ, обеспечивающие чувствительную иннервацию каудальных отделов толстой кишки (нисходящая ободочная и прямая кишка), характеризовались относительно небольшими размерами и неоднородным составом популяций. Это, в целом, соответствует литературным данным о преобладании в КСГ у кошек нейронов относительно небольших размеров [16]. Более того, предполагается, что размеры этих нейронов могут коррелировать с диаметром их периферических отростков, образующих аффе-

рентные волокна тазового нерва, и скоростью проведения возбуждения по ним [11], а также, возможно, и с их нейрохимическими особенностями, как это было показано на крысах и мышках [6]. Аналогичные данные были получены и для поясничных ганглиев у кошек [8].

Таким образом, в афферентной иннервации каудальных отделов толстой кишки принимают участие чувствительные нейроны всех КСГ, причем большая часть этих клеток находится в ганглии, соответствующем сегменту S_{II} , и представлены морфологически неоднородными популяциями псевдоуниполярных нейронов. Чувствительная иннервация краниального отдела толстой кишки менее выражена по сравнению с каудальными отделами и осуществляется в основном псевдоуниполярными нейронами ганглиев, соответствующих сегментам S_{II} – S_{III} . Общее количество чувствительных клеток КСГ кошки, осуществляющих афферентную иннервацию толстой кишки, возрастает в краниокаудальном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

- Багаев В.А. и Макаров Ф.Н. Дорсальное моторное ядро блуждающего нерва и его роль в иннервации пищеварительного тракта. *Морфология*, 1997, т. 111, вып. 1, с. 7–14.
- Багаев В.А. и Пантелеев С.С. Афферентное звено в системе бульбарной регуляции моторной функции желудка. *Физиол. журн.*, 1996, т. 82, № 5–6, с. 121–131.
- Багаев В.А., Филиппова Л.В., Акоев Г.Н. и Макаров Ф.Н. Экстраорганные источники парасимпатической иннервации тонкой кишки в области связки Трейтца. *Нейрофизиология*, 1992, т. 24, № 4, с. 423–430.
- Ноздрачев А.Д. Физиология вегетативной нервной системы. Л., Медицина, 1983.
- Altschuler S.M., Escardo J., Lynn R.B. and Miselis R.R. The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *J. Gastroenterol.*, 1993, v. 104, p. 502–509.
- Christianson J.A., Traub R.J. and Davis B.M. Differences in spinal distribution and neurochemical phenotype of colonic afferents in mouse and rat. *J. Comp. Neurol.*, 2006, v. 494, p. 246–259.
- De Groat W.C. and Krier J. The sacral parasympathetic reflex pathway regulating colonic motility and defaecation in the cat. *J. Physiol.*, 1978, v. 276, p. 481–500.
- Garry M.G., Miller K.E. and Seybold V.S. Lumbar dorsal root ganglia of the cat: a quantitative study of peptide immunoreactivity and cell size. *J. Comp. Neurol.*, 1989, v. 288, № 4, p. 698.
- Kawatani M., Nagel J. and de Groat W.C. Identification of neuropeptides in pelvic and pudendal nerve afferent pathways to the sacral spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 1986, v. 249, p. 117–132.
- Krogh K., Christensen P. and Laurberg S. Colorectal symptoms in patients with neurological diseases. *Acta Neurol. Scand.*, 2001, v. 103, p. 335–343.
- Lee K.H., Chung K., Chung J.M. and Coggeshall R.E. Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 1986, v. 243, № 3, p. 335–346.
- Mesulam M.-M. Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, v. 26, № 2, p. 106–117.
- Nadelhaft I. and Booth A.M. The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: a horseradish peroxidase study. *J. Comp. Neurol.*, 1984, v. 226, № 2, p. 238–245.
- Satomi H., Yamamoto T., Ise H. and Takatama H. Origins of the parasympathetic fibers to the cat intestine as demonstrated by the horseradish peroxidase method. *Brain Res.*, 1978, v. 151, p. 571–578.
- Sengupta J.N. and Gebhart G.F. Gastrointestinal afferent fibers and sensation. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3-rd edit. New York, Raven Press, 1994, p. 483–519.
- Szarijanni N. and Rethelyi M. Differential distribution of small and large neurons in the sacrococcygeal dorsal root ganglia of the cat. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 1979, v. 27, p. 25–35.
- Tai C., Booth A. M., de Groat W. C. and Roppolo J. R. Colon and anal sphincter contractions evoked by microstimulation of the sacral spinal cord in cats. *Brain Res.*, 2001, v. 889, № 1–2, p. 38–48.

Поступила в редакцию 10.05.2006 г.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF NEURONS OF SPINAL SACRAL GANGLIA INNERVATING THE COLON

A.A. Dorofeyeva, S.S. Panteleyev, L.A. Markova, Ye.B. Pluzhichenko, V.A. Bagayev and F.N. Makarov

The localization and morphological features of viscerosensory neurons of sacral spinal ganglia (SSG), innervating the colon, were investigated. In urethane anaesthetized cats, the solution of horseradish peroxidase was injected under the serosa of ascending and descending parts of the colon as well as of the rectum. After 48 hours animals were repeatedly anesthetized and transcardially perfused. Sections of SSG were stained according to Mezuham protocol (1978). All the regions of the colon studied were shown to receive afferent innervation from neurons of SSG S_I , S_{II} and S_{III} . Maximum number of the labeled cells was detected in SSG S_{II} . The intensity of afferent innervation of the colon by the neurons of SSG was found to increase along its length in cranio-caudal direction.

Keywords: colon, sensory innervation, sacral spinal ganglion, horseradish peroxidase technique.

Laboratory of Cortico-Visceral Physiology and Laboratory of Neuromorphology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg.