

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ

Д-р Ангел Димчев Дандов

МОРФОЛОГИЧНА И НЕВРОХИМИЧНА ПЛАСТИЧНОСТ В
МЕЗЕНЦЕФАЛНОТО ТРИГЕМИНАЛНО ЯДРО НА ПЛЪХ
СЛЕД ПЕРИФЕРНА НЕРВНА УВРЕДА

ДИ С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователната и научна степен
«ДОКТОР»

Научна специалност: Анатомия, хистология и цитология

Научен ръководител: проф. д-р Николай Е. Лазаров, д.м.н.

СОФИЯ, 2016

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	3
I. УВОД	4
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	7
2.1 Ембрионален произход на мезенцефалните тригеминални неврони	7
2.2 Морфология на мезенцефалното тригеминално ядро.	8
2.3 Ултраструктура на мезенцефалното тригеминално ядро	11
2.4 Функционална характеристика на мезенцефалното тригеминално ядро .	13
2.5 Неврохимия на мезенцефалното тригеминално ядро	17
2.6 Структурна пластичност на мезенцефалното тригеминално ядро след периферна увреда	21
2.7 Неврохимична пластичност на мезенцефалното тригеминално ядро	25
2.8 Състояние на проблема	27
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	28
IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	29
4.1 Експериментални животни и оперативна интервенция	29
4.2 Хистологични техники	30
4.2.1 Вземане и подготвяне на материала	30
4.2.2 Рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин.	31
4.2.3 Оцветяване по Nissl.	32
4.2.4 Оцветяване с Neutral red.	32
4.3 Хистохимични методи	33
4.4 Имунохистохимични методи	34
4.4.1 Имунохистохимична процедура	34
4.4.2 Контрол и специфичност на антителата	36
4.5 Обработка и анализ на изображенията	36

V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ	38
5.1 Локализация и нормална морфология на мезенцефалното тригеминално ядро.	38
5.2 Морфологични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия.	42
5.3 Неврохимични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия	57
5.3.1 Пластични промени в експресията на класически невротрансмитери	57
5.3.2 Пластични промени в експресията на невроактивни пептиди.	62
5.3.3 Пластични промени в експресията на калций-свързващи протеини .	66
5.5 Статистически анализ на резултатите.	69
VI. ОБСЪЖДАНЕ	81
6.1 Структурна пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони . .	81
6.2 Неврохимична пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони .	85
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БЪДЕЩИ НАСОКИ	93
VIII. ИЗВОДИ	95
IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	97
X. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	99
XI. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	100
XII. БИБЛИОГРАФИЯ	101
XIII. SUMMARY	122
БЛАГОДАРНОСТИ	123

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

АДА	аденозиндеаминаза
ЕР	ендоплазмен ретикулум
ГАМК	гама-аминомаслена киселина
ПНС	периферна нервна система
ТГ	тригеминален ганглий
ЦНС	централна нервна система
Aq	<i>aqueductus cerebri</i>
СВ	калбиндин
СGRP	калцитонин ген-родствен пептид
GAL	галанин
Glu	глутамат (глутаминова киселина)
LC	<i>locus coeruleus</i>
LPB	латерално парабрахиално ядро
Me5	мезенцефално тригеминално ядро
MPB	медиално парабрахиално ядро
NADPH-d	никотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафороза
NPY	невропептид Y
PV	парвалбумин
scp	<i>pedunculus cerebellaris superior (brachium conjunctivum)</i>
SP	субстанция P
4V	<i>ventriculus quartus</i>
VIP	вазоактивен интестинален пептид

І. У В О Д

Първичните сетивни неврони, чиито тела принципно се разполагат в клетъчни струпвания, наречени ганглии, предават соматосензорна информация към невроните в централната нервна система (ЦНС) от различни по вид сетивни рецептори в периферията. За разлика от спиналните и по-голямата част от черепномозъчните сетивни ганглии, една от най-характерните особености на тригеминалната сетивна система е това, че телата на първичните тригеминални аферентни неврони са разположени както в тригеминалния ганглий (ТГ), така и вътре в ЦНС, а именно в мезенцефалното тригеминално ядро (Me5), лат. *nucleus mesencephalicus nervi trigemini* (Ramón y Cajal, 1896, 1909; Scharf, 1958; Brodal, 1981; Usunoff et al., 1997; Marani and Usunoff, 1998; Lazarov, 2000). Някои изследователи на тригеминалната сетивна система приемат, че ТГ представлява краниален аналог на спинален ганглий в периферната нервна система (ПНС) (Darian-Smith, 1973). От друга страна, Me5 е единственото известно досега мозъчно ядро, което съдържа клетъчните тела на първични аферентни неврони (Johnston, 1909; Freeman, 1925). Me5 също така е уникално и с това, че неговите клетки съставляват един ясно разграничен функционален клас от тригеминални сетивни неврони, които обслужват изключително проприоцептивната сетивност.

Невроните на ТГ получават аферентна информация основно от механорецептори (за натиск и разтягане), терморецептори (за температурни промени) и ноцицептори (за болкова чувствителност), разположени в областта на лицето, устната и носната кухина (Dubner et al., 1978; Davies, 1988). Също така, със сигурност е установено, че псевдоуниполярните неврони на ТГ получават проприоцептивна информация от дъвкателните мускули, по-конкретно от мускулите, които участват в затварянето и отварянето на долната челюст (Shigenaga et al., 1988b). Техните централни аксони образуват синаптични контакти върху няколко групи неврони от втори порядък, които от

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

своя страна провеждат импулси до соматосензорната кора на мозъка, преминавайки през таламуса (Kruger and Young, 1981; Pfaller and Arvidsson, 1988). Някои от невроните от втори порядък, обаче, образуват локални мрежи в ЦНС и централните им израстъци не достигат до кората (Yoshida et al., 1994, 1998).

Невроните на Me5 инервират главно мускулни вретена в дъвкательните и мускулите на очната ябълка (Alvarado-Mallart et al., 1975; Capra et al., 1985; Shigenaga et al., 1988a), както и други видове рецептори в периодонталните лигаменти (Jerge, 1963; Byers and Holland, 1977; Byers, 1985; Byers et al., 1986; Shigenaga et al., 1988c; Byers and Dong, 1989; Linden et al., 1994) и зъбната пулпа (Amano et al., 1987; Yoshino et al., 1989).

Първичните тригеминални сетивни (аферентни) неврони споделят общ ембрионален произход, но са с различна съдба по време на развитието си. Различните популации от клетки, които съставят ТГ и Me5, могат да бъдат идентифицирани въз основа на техните морфологични характеристики, невротрансмитерен профил и електрофизиологичните им особености. От морфологична гледна точка се счита, че невроните на Me5 са много подобни или даже еднакви с клетките в черепномозъчните и спиналните ганглии (Johnston, 1909; Freeman, 1925). Също така се смята, че периферните израстъци на невроните на Me5 имат същата скорост на провеждане на нервния импулс като механорецепторните аферентни неврони с нисък праг на възбудимост в ТГ (Byers and Matthews, 1981; Byers and Dong, 1989; Byers, 1985). Досега остава неизяснено, обаче, до каква степен тези неврони се различават по отношение на неврохимичната си характеристика, както и дали те имат еднакъв невротрансмитерен и модулаторен профил. Изясняването на този въпрос е от ключово значение, тъй като невротрансмитерната характеристика и синтез на невроактивни вещества на различните невронални популации често е в пряка взаимовръзка с таргетните им проекции. Предполага се, че тригеминалните първични аферентни неврони проявяват белези на инервационно-специфична

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

неврохимична експресия. Тази концепция е наречена неврохимично кодиране (Costa et al., 1986).

Понастоящем е добре известно, че увредата на периферен нерв индуцира динамични и адаптивни промени в структурата и неврохимичния състав на невроните в зоните, инервирани от увредения нерв, феномен най-общо известен като невропластичност и, по-конкретно като структурна и химична пластичност (Hökfelt et al., 1994). Известно е също така, че мезенцефалните тригеминални неврони са много чувствителни към периферна нервна увреда, която води до значителна клетъчна загуба (Raappana and Arvidsson, 1992; Ichikawa et al., 2007). От друга страна, тяхното преживяване в променените околни условия широко зависи от присъствието на определени невротрофни фактори (Lazarov, 2000, 2002, 2007; Ichikawa et al., 2007).

Настоящото проучване е опит да разкрие морфологичните и неврохимични промени в Me5 в отговор на периферна нервна аксотомия.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Ембрионален произход на мезенцефалните тригеминални неврони

Първичните сетивни неврони произлизат от задебеления на ембрионалната ектодерма. Основното място на техния произход е нервният гребен, образуващ се по латералните ръбове на нервната пластинка. Там клетките се отделят от невроепитела, мигрират и дават началото на невроните във всички спинални ганглии, а също се диференцират в някои от възловите сетивни неврони на черепномозъчните нерви (Davies and Lumsden, 1990). По време на първоначалната си миграция от невроепитела всички клетки, произхождащи от нервния гребен, са с еднакви морфологични белези (Weston et al., 1984).

Невронната популация на Me5 изцяло произхожда от мезенцефалните клетки на нервния гребен (Narayanan and Narayanan, 1978; Stainier and Gilbert, 1991), чиято миграция в посока навътре към крайната си локализация в ростралната част на ромбенцефалона е центрипетална (Weston, 1970; Davies and Lumsden, 1990). При по-низшите гръбначни, обаче, се предполага, че невроните на Me5 са с двоен произход – както от нервния гребен, така и от аларната пластинка (Piatt, 1945). В началото на осмия ембрионален ден (E8), невроните на Me5 започват бавно, но непрестанно диференциране, продължаващо до E12, като през този период не се отбелязва делене и увеличаване броя на клетъчната популация (Stainier and Gilbert, 1990). Bruska и Wozniak (1992) правят проучване на ранното развитие на Me5 в човешкия ембрион във фаза на развитие 14-15 ембрионален ден и успяват да разпознаят малка група от овални клетки, непосредствено разположени рострално от *sulcus limitans* в сгъвката на моста. При човек невроните на Me5 започват диференциацията си в предела на външните граници на сивото мозъчно вещество около Силвиевия водопровод (*substantia grisea centralis*) на аларната пластинка, което е документирано при ембриони на осем или повече седмици (Pearson, 1949 a,b). Трябва да се подчертае също така, че над 50% от първоначално зародилата се невронна популация в ТГ на мишка (Davies and Lumsden, 1990) и в Me5 на хамстер

(Alley, 1974) загива много скоро след като е инервирала съответните си мишени, като тази фаза на клетъчна смърт продължава от E13 до E19.

2. Морфология на мезенцефалното тригеминално ядро

Началото на проучването на Me5 поставя видния испански невроморфолог, Ramón y Cajal в далечната 1896 година. Вниманието на „бащата” на съвременната невробиология, получил Нобелова награда за физиология или медицина за своите фундаментални изследвания върху структурата на нервната система, е било привлечено от това необикновено ядро и до голяма степен схващанията му за неговия строеж остават непроменени и до ден днешен. Оттогава, вече 120 години, интересът на учените, работещи в областта на невробиологията на тригеминалната сетивна система, към това необичайно по произход, структура и функция сетивно ядро, разположено в мозъчния ствол, е огромен и проучванията върху него усърдно продължават през годините.

Me5 е една загадъчна и донякъде парадоксална структура в ЦНС. С пълно право много автори и негови изследователи го наричат „уникално” ядро. Неговата необичайност се дължи на обстоятелството, че то е единственото известно досега мозъчно ядро, изградено от първични аферентни неврони (Johnston, 1909; Freeman, 1925). То е разположено в ростралната част на моста и по цялото ростро-каудално протежение на средния мозък. В триизмерното пространство ядрото има формата на удължена капка и прилича на сълза, като перикарионите на повечето (70-80% в плъх) мезенцефални тригеминални неврони са съсредоточени в разширената мостова част на ядрото (Rokx et al., 1986; Copray et al., 1990b), а в рострална посока клетъчните им тела са подредени в редица по латералната граница на сивото мозъчно вещество около *aqueductus mesencephali (cerebri)*. При различните бозайници дължината му е различна, като в плъх тя е около 4 мм, у котка е приблизително 7 мм, а при човек достига 24-26 мм (Lazarov and Chouchkov, 1997; Usunoff et al., 1997; Lazarov, 2000). Каудално ядрото започва от нивото на моторното и основното сетивно ядро на *n. trigeminus (nucleus motorius et principalis nervi trigemini)*, а краниално достига до ядрото на задната комисура и ростралния

край на *colliculus superior*. Намиращите се дълбоко в мостовата част на ядрото мезенцефални тригеминални неврони формират струпвания от две до девет клетки, разположени в триъгълника, образуван от *locus coeruleus* и парабрахиалния ядрен комплекс (Coraу et al., 1990b).

Me5 е изградено от две субпопулации нервни клетки (Sturrock, 1987; Shigenaga et al., 1988; Luo et al., 1991; Mineff et al., 1998; Lazarov et al., 1998; Лазаров, 2000):

1. множество на брой големи (в плъх: 30-55 μm в диаметър; в котка: 35-70 μm) сферични и/или овоидни и единични малки (плъх: до 25 μm ; котка: до 30 μm в диаметър) (псевдо)униполярни неврони. Те са известни като тип А неврони;
2. сравнително по-малко на брой мултиполярни клетки с варираща големина: 15-20 μm в диаметър в плъх и 30-50 μm при котка, наречени тип С неврони (Mineff et al., 1998). От своя страна, тази субпопулация е допълнително подразделена на малки и големи неврони, обозначени съответно като подтип *a* и *b* неврони, в зависимост от големината на техните перикариони (Sivanandasingham and Warwick, 1976).

Макар че голям брой изследвания предполагат, че мултиполярните неврони не са типични клетки за Me5 и че подобна морфология представлява преходен етап по време на филогенетичното и онтогенетичното му развитие (Hinrichsen and Larramendi, 1969; Sivanandasingham and Warwick, 1976; Yoshida and Oka, 1998), преобладаващото мнение е, че тези мултиполярни клетки са една стабилна и постоянна субпопулация от невроните на Me5 (Walberg, 1984; Nomura et al., 1985; Lazarov, 2000). Съдържанието на малките мултиполярни неврони при различните видове гръбначни животни е различно като при плъх то варира между 5 и 13 % (Liem et al., 1991; Luo et al., 1991), докато при котка достига до 40% от невроналната популация в ростралната част на Me5 (Nomura et al., 1985). Присъствието на мултиполярни неврони в Me5 е потвърдено благодарение на многобройни и разнообразни изследвания, при които са използвани различни трасиращи техники (Gottlieb et al., 1984; Walberg, 1984; Walberg et al., 1984; Nomura and Mizuno, 1985; Nomura et al., 1985), както и имунохистохимични и

имуноцитохимични методи (Lazarov and Chouchkov, 1995; Mineff et al., 1998). Схващането на самия Ramon у Cajal за мултиполярните неврони в Me5 е, че те представляват мигрирали от *locus coeruleus* клетки по време на ембрионалното развитие (Ramon у Cajal, 1909).

На нивото на средния мозък, около 60% от невроните в Me5 на котка, разположени рострално, са типични псевдоуниполярни клетки, докато останалите са мултиполярни неврони (Nomura et al., 1985; Lazarov, 2000). По-голямата част от невроните на Me5 (60 – 80%) обаче са локализирани в каудалната част на ядрото (Rokx et al., 1986; Copray et al., 1990a).

Както изтъква Lazarov (1996), двата вида мезенцефални тригеминални неврони показват голямо сходство в своята морфология, с изключение на наличието на повече от един израстък при мултиполярните неврони. Me5 невроните могат да бъдат приети за краниален аналог на клетките на спиналните ганглии, но това което ги отличава от тях е наличието на аксосоматични синаптични контакти върху техните перикариони (Coprav et al., 1990c; Liem et al., 1992). Основният тип клетки в Me5, а именно псевдоуниполярните неврони, имат само един израстък (аксон), който се раздвоява на централен и периферен израстък (Luo et al., 1991). Освен това са описани шипоподобни израстъци, силно наподобяващи парафитите на сетивните неврони в ганглиите, произлизащи от телата на невроните в Me5 (Hinrichsen and Larramendi, 1970; Alley, 1974). Телата на невроните на Me5 са частично обвити от израстъците на астроглиални клетки (Hinrichsen and Larramendi, 1970; Imamoto and Shimizu, 1970; Coprav et al., 1990a), поради което повърхността на перикарионите и типичните за тези клетки къси шиповидни цитоплазмени протрузии влизат в пряк контакт с елементи на невропила. Всъщност, електронномикроскопските наблюдения доказват наличието на аксо-соматични контакти върху телата на невроните на Me5 във всички биологични видове, като например при риби скатове (Witkovsky and Roberts, 1976), жаби (Matesz, 1994), патици (Bortolami et al., 1969), мишки (Hinrichsen and Larramendi, 1968, 1970), плъхове (Imamoto and Shimizu, 1970; Inagaki et al., 1987; Yamamoto et al., 1988; Liem et al., 1991, 1992), хамстери (Alley, 1974), морски свинчета (Manni et al., 1982), зайци (Lucchi et al., 1972),

прасета (Lucchi et al., 1972) и котки (Hinrichsen and Larramendi, 1970; Nomura et al., 1985; Lazarov, 1995b, 1996; Zhang et al., 1997). Освен това, в ядрото са описани и аксодендритни синапси (Walberg, 1984; Gottlieb et al., 1984; Nomura et al., 1985).

Броят на мезенцефалните тригеминални неврони при различните животински видове е различен. Причината за това не е само във видовото разнообразие, но и в начина, използван от различните изследователи, за преброяването им в различни експериментални животни. Според Rokx и съавт. (1986) общият брой на клетките в Me5 на плъх може да достигне до 1600.

Понастоящем се знае със сигурност, че невроните на Me5 са функционално хомогенна популация (Corbin and Harrison, 1940; Jerge, 1963; Cody et al., 1972; Linden, 1978) и че всички те, без изключение, участват в сетивната модулация на проприоцептивната информация в областта на лицето и устната кухина. Освен това, голям брой данни подкрепят тезата, че невроните на Me5 функционират като интерневрони, контролиращи мускулите на лицето и устната кухина (Roberts and Witkovsky, 1975; Nagy et al., 1986; Kolta et al., 1990; Ter Horst et al., 1991; Shammah-Lagnado et al., 1992; Del Negro and Chandler, 1997).

3. Ултраструктура на мезенцефалното тригеминално ядро

Подробна ултраструктурна характеристика на невроните на Me5 е направена от Lazarov (2000) в монографията му *The Mesencephalic Trigeminal Nucleus in the Cat* (Springer).

Изследвано с електронен микроскоп, Me5 е твърде подобно по структура на останалите ядра в ЦНС. То се състои от гъста синаптична зона, „примесена” по сложен начин с нервни клетки, както и комплекс от аксони и дендрити, влизащи в контакт с невроглия и кръвоносни съдове. Принципно двата типа мезенцефални тригеминални неврони демонстрират много на брой прилики по отношение на морфологията си, с изключение на факта, че мултиполярните клетки притежават повече от един израстъци. Електронната микроскопия разкрива, че невроналните клетъчни тела имат голямо и окръглено или овоидно ядро (с големина 10 – 30 μm), което е с няколко вгъвания, заема централна или периферна позиция, както и

обилно количество цитоплазма около ядрото, в която са струпани повечето органели. Ядрата на повечето неврони са електронно просветлени със светла нуклеоплазма и почти изцяло деспирализиран хроматин, представен като еухроматин. В повечето случаи се наблюдава и присъствие на единично голямо, със сферична форма, мрежовидно ядърце.

Клетъчните тела и на двата типа неврони на Me5 притежават богата на органели цитоплазма, съдържаща огромен брой рибозоми и полизоми, обилен гранулиран ендоплазмен ретикулум (EP), добре изразен апарат на Golgi, множество митохондрии и лизозоми, както и малко на брой везикули и цитоскелет от тубулни структури – невротубули и неврофиламенти. Изобилстващите приплеснати цистерни на гранулирания EP са плътно подредени успоредно една до друга. Освен това, ендоплазменият ретикулум неизменно се асоциира с голям брой свободни рибозоми и полизоми, пръснати между цистерните му, които сумарно образуват изолирани островчета от Нислови грануляции. Апаратът на Golgi типично е много добре изразен и на ултраструктурно ниво често е наблюдаван като успоредни струпвания на сплеснати или раздути сакове, намиращи се около ядрото. В близост до тази зона, в цитоплазмата се наблюдават различни по вид лизозоми, най-вече липофусцинови телца, както и липофусцинови пигментни гранули. Една от впечатляващите особености на невроните на Me5 е струпването в цитоплазмата им на малки, с хомогенна структура, или по-големи хетерогенни мембранно-ограничени телца. Вторите се състоят от фин гранулиран матрикс, в който са включени плътни частици, електронно-прозрачни глобуларни структури и плеоморфни отлагания с различна природа. Други добре застъпени органели са митохондриите с разнообразна големина и форма, които най-често са пръснати из цитоплазмата на перикариона, но са особено много в близост до местата на контакт между две съседни клетки, където са подредени един до друг. Клетъчните мембрани образуват контакти от адхерентен тип, наречени макули, от десмозомо-подобен тип. В клетъчните тела на невроните се наблюдават и други цитоплазмени органели, като гладък EP, неврофиламенти и пероксизоми. В повечето случаи гладкият EP е асоцииран или с единични гликогенови гранули или със струпвания

на гликогенови частици в такива зони на перикариона, които са богати на този полизахарид.

Друга интересна обща структурна характеристика на невроните на Me5 е наличието на серийно подредени къси издавания на цитоплазмата (евагинации), които също така биват наричани шипове и са известни като парафити в сетивните ганглийни клетки. Тези цитоплазмени издавания произхождат от клетъчното тяло или от началния сегмент на аксона и са обвити от израстъци на глиални клетки или от дендрити. Те съдържат малки струпвания от гранулиран ЕР, както и фини успоредно подредени снопчета от неврофиламенти, разпръснати между тях.

Освен това, началният сегмент на основния израстък и аксоналният хълм се характеризират с редица морфологични особености. На първо място, отчита се отсъствие на свободни рибозоми и гранулиран ЕР, както и наличие на разнообразен брой снопчета от микротубули и неврофиламенти. Наблюдават се също малко на брой митохондрии и слабо развит гладък ЕР. Тази проксимален сегмент на аксона е обвит от израстъци на астроцити и на него не се виждат синаптични контакти.

4. Функционална характеристика на Me5

Още в началото на миналото столетие на изследователите са били известни клетъчния произход на мезенцефалното коренче на тригеминалния нерв и по-голямата част от връзките на ядрото с други структури в ЦНС (Драганов, 2006). Независимо от това обаче, неговото физиологично значение и функционалните му модалности продължават да бъдат ненапълно изяснени. По онова време, схващанията за функционалните характеристики на коренчето са се базирали главно на морфологични данни за него. Същите са получени въз основа на дегенерационния метод на Marchi (1886) или на метода на хроматолиза, както и на познанията за централните и периферни връзки на ядрото с други структури. Дълго време се е считало, че кожната инервация на устно-лицевата област е свързана единствено с невроните на ТГ и опитите за изясняване на функцията на Me5 са се свеждали главно до сравняването на неговите клетки с тези в заднокоренчевите

(спиналните) и тригеминалните ганглии (Wallenberg, 1904; Clark, 1926; Schneider, 1928; Sheinin, 1930). Ето защо не е никак изненадващо, че Huguenin (1879) приписва вазомоторна функция на ядрото, Held (1893) говори за секреторна, а Merkel (1874) приема, че то има трофична функция. Същата обаче е отречена от Duval (1879). Kölliker (1896) смята, че мезенцефалното коренче на тригеминалния нерв е двигателен нерв за *m. tensor veli palatini* и *m. tensor tympani*. Главният аргумент в подкрепа на еферентната функция на ядрото според него са връзката му с моторното коренче на тригеминалния нерв, централното мозъчно разположение на клетките, от които то произлиза, относителната дебелина на неговите влакна и липсата на друго приемливо обяснение по онова време. Към тях по-късно Ramón y Cajal (1909) прибавя и дегенерацията на клетките след извънмозъчно прерязване (аксотомия) на тригеминалния нерв.

Противоречивите схващания относно функцията на Me5 в началото на миналия век произтичат както от липсата на физиологични експерименти, така и от отсъствие на клинични наблюдения в тази насока. По това време се е предполагало единствено, че сетивните рецептори в дъвкателните мускули и околосъбната тъкан са включени в иницирането на специфични рефлексни на челюстта, те участват в осигуряването на механорецептивна информация, сравнима с устната стереогнозия, а също така са свързани с ноцицепцията в областта на лицето и устната кухина. Willems (1911) пръв изказва предположението, че Me5 е проприоцептивен орган, носещ информация за сетивността от мускулите, които затварят долната челюст. Проприоцептивната функция на Me5 е допускана впоследствие и от Allen (1919) и Freeman (1925). Една немалка група автори свързват функционално Me5 изключително с дълбоката сетивност, провеждана от дъвкателните мускули (Johnston, 1909; May and Horsley, 1910; Kosaka, 1912; Allen, 1919; Corbin and Harrison, 1940; Szentágothai, 1948; Jerge, 1963; Bortolami and Filogamo, 1964), докато други поддържат тезата за връзката на ядрото и с проприоцепцията на външните очни мускули (Freeman, 1925; Weinberg, 1928; Sheinin, 1933; Tarkhan, 1934; Fillenz, 1955; Alvarado-Mallart et al., 1975), и дори със зъбите и твърдото небце (Corbin and Harrison, 1940). Систематичните изследвания на Corbin (1940) и Corbin и Harrison

(1940) са допринесли много за изясняването на функцията на ядрото. Авторите успяват да идентифицират периферното разпределение на влакната на Me5 и да докажат, че ядрото се активира от движенията при отварянето на устата и при упражняването на натиск в устната област. В действителност пръв Sherrington (1917) достига до заключението, че мускулите, затварящи устата, упражняват рефлекс на разтягане, а впоследствие Harrison и Corbin (1942) успяват да демонстрират връзката на Me5 с така наречения jaw-jerk рефлекс (рефлексно притракване на челюстта) доказвайки, че централните и периферните лезии на ядрото водят до отпадането на рефлекса. Те също така изказват предположението, че аферентните от мускулните вретена биха могли да осъществяват моносинаптично свързване с ипсилатералните тригеминални неврони и по такъв начин да допринесат за осъществяване на рефлекса за разтягане на челюстта. С помощта на анатомични методи Szentágothai (1948) успява да определи, че се касае за един моносинаптичен стволов рефлекс и правилно предполага, че Me5 изгражда аферентната част на рефлексната дъга. Последвалите физиологични експерименти на Hugelin и Bonvallet (1957) представят убедителни функционални доказателства за моносинаптичната природа на този път, чието наличие и характер са потвърдени по-късно и от вътреклетъчни микроелектродни (Nakamura et al., 1967; Kidikoro et al., 1968; Appenteng et al., 1978) и ултраструктурни (Luo and Li, 1991) изследвания. Така се стига до постулата, че аферентните влакна на мускулните вретена на дъвкателните мускули осъществяват моносинаптична възбудна връзка с невроните в тригеминалното моторно ядро (Nozaki et al., 1985; Shinegaga et al., 1988b; Yabuta et al., 1996), но също така и с интерневроните или премотоневроните, заобикалящи двигателното ядро на троичния нерв (Luo et al., 1991). Междувременно е установено наличието и на допълнителен полисинаптичен път между невроните на Me5 и тригеминалните мотоневрони на мускулите, затварящи устата чрез премоторните неврони (Mizuno et al., 1983; Shinegaga et al., 1988d). Счита се, че потенциалното присъствие на интерневрони или премотоневрони във веригата допринася за модулирането на невроналната активност в Me5. В подкрепа на тази хипотетична възможност говори заключението на Appenteng и сътр. (1978), че

аференции от вретената в дъвкателните мускули притежават съществени характеристики, необходими за негативен feedback контрол на активното мускулно скъсяване. До този извод авторите достигат отчитайки, че силата на обратния контрол е твърде умерена, поне на този, осъществяван по моносинаптичен път. В по-нови изследвания Вае и др. (1996) демонстрират наличието на моносинаптична рефлексна дъга между периодонталните аферентни терминали и предполагаемите масетерни β -мотоневрони в тригеминалното моторно ядро. От казаното дотук следва да се направи генералният извод, че мезенцефалните тригеминални неврони играят съществена роля в контрола и координирането на двигателната дейност в областта на лицето и устната кухина. Те провеждат потенциално важната информация за положението и движението на долната челюст, както и налягането върху зъбите. Изглежда твърде вероятно тази проприоцептивна информация да е от огромно значение още в ранните стадии на двигателното обучение или при дълготрайното му поддържане.

В последно време някои авторски колективи, на базата на генетични, трасиращи и имунохистохимични проучвания, акцентират върху нови функционални модалности на Me5. През изминалото десетилетие интересът на учените се насочва към една интересна тенденция по отношение на ядрото, а именно ролята му в модулирането на циркадните ритми и усещането на глад и ситост. Hiler и съавтори (2008), на базата на *in vitro* и функционални изследвания, достигат до заключението, че Me5 представлява един дискретен циркаден часовников механизъм, чиито функции са координирани със супрахиазматичното и туберомамиларното ядро, водещи биологични часовници на тялото, разположени в хипоталамуса (Yokoyama et al., 2013). Предвид доказаната връзка между Me5 и туберомамиларното ядро (Stoyanova and Lazarov, 2005b; Lazarov and Gratzl, 2006; Umehara et al., 2012) и поради ролята и на двете структури в регулирането на чувството за ситост (Fujise et al. 1993), понастоящем се счита за твърде възможно биологичният часовник на нашия организъм, контролиращ циркадните ритми, да е свързан с Me5 и да служи като контролиращо звено за хранителното поведение през денонощието. Най-нови данни демонстрират пряка връзка между латералната

хабенула и Me5 у плъх, което подсказва възможността движенията на долната челюст при стресови ситуации да бъдат модулирани от това лимбично ядро, което е прието за център на негативните емоции като болка, стрес и тревога (Ohara et al., 2016).

5. Неврохимия на Me5

Първичните тригеминални аферентни неврони представляват разнородна група по отношение на неврохимичния си състав. Счита се, че те синтезират и използват в синаптичната си трансмисия разнообразни доказани неврохимични медиатори, както и редица кандидати за такива (Weihe, 1990; Lazarov, 2000). Тези медиатори включват класически и пептидни трансмитери, калций-свързващи протеини и други невроактивни вещества. Освен това, съдържанието на неврохимичните субстанции в първичните аферентни неврони не е статично, поради което експресията и нивата им биха могли да варират, особено в случай на резки промени в условията на околната среда и състоянието на организма (травма, прекъсване на нерв, температурен шок). Такива вариации на невромедиаторите са описани както в невроните на Me5, така и на ТГ. Освен това е доказано, че сетивните тригеминални неврони са синаптично свързани с различни участъци на ЦНС, съдържащи разнообразни трансмитерни вещества (Coprav et al., 1990a,b, 1991; Kolta et al., 1991b, 1993; Kummer, 1994; Lazarov, 2000). Установено е също така че невроните на Me5 получават катехоламинергична, нитрергична и пептидергична инервация под формата на периневронални арборизации, които се разполагат около инунонегативните им големи тела като влакна, наподобяващи кошнички (Lazarov, 2002, 2007). Смята се, че тези перицелуларни влакна представляват оригинален способ за комуникация между имунопозитивните проекции към ядрото и имунонегативните невронални тела при обработката на соматосензорната информация в областта на устната кухина и лицето. Не на последно място е установено със сигурност, че клетките в Me5 са с богат набор от постсинаптични рецептори за огромен брой невротрансмитери и невроактивни вещества.

Концепцията за химична невротрансмисия датира от началото на миналия век, но нейното значение за ЦНС става очевидно много по-късно (Carlsson, 1987). Осемдесетте години на ХХ век бележат началото в развитието на ново научно направление в биологията на нервната тъкан – неврохимията. Хистохимията е първоначалния наличен инструмент за изследването и подреждането на пъзела на химичната невроанатомия на мозъка и разгадаването на невротрансмитерния лабиринт в ЦНС, в това число и в тригеминалната сетивна система. В този смисъл хистохимичните изследвания на Horinouchi (1959), Nakajima (1965), Maeda (1966), Fernández-Fernández и др. (1990), Лазаров (1991) и Lazarov (1994a) допринасят много за изясняване на ензимния набор и метаболизма на мезенцефалните тригеминални неврони. Така например е установено, че те съдържат голямо количество гликоген и че ензимите, включени в глюкозния метаболизъм се различават по своята активност в средните и големите по размер клетки в Me5. Тези първи изследвания се ограничават главно до разкриването на функционалната и биохимична природа на градивните клетки в ядрото. Като първа стъпка към изясняване на възможните невромедиатори, които се освобождават в химичните синапси на Me5, De Montigny и Lund (1980) тестват микройонтофоретично невротрансмитерни кандидати, в това число възбудни и инхибиторни аминокиселини, ацетилхолин, норадреналин, допамин и хистамин, но не успяват да установят ефект на нито един от тях върху мембрания потенциал на неговите неврони. За разлика от тези автори, десет години по-късно Fernández-Fernández и сътр. (1990) визуализират активност за ключови ензими от веригата за синтез на някои аминокиселини като аспартат-аминотрансфераза и гама-аминомаслена киселина-трансаминаза.

Следващата стъпка към подреждането на мозайката на неврохимичната трансмисия в Me5 се основава на резултати от имунохистохимични експерименти. Бурното развитие на имуноцитохимията в последните три десетилетия на миналия век разкри, че мезенцефалните тригеминални неврони по всяка вероятност използват различни кандидати за химични медиатори в синаптичната трансмисия. Тук се включват класически и пептидни трансмитери, калций-свързващи протеини

и някои други невроактивни молекули като напр. азотен оксид. Много от тях са идентифицирани в аферентните проекции до Me5 и само малка част са намерени в клетъчните тела на невроните.

В едно от първите изследвания, посветени на изясняване на невротрансмитерната принадлежност на невроните в Me5, Inagaki и сътр. (1987), използвайки антитяло срещу хистидиндекарбоксилаза (хистамин синтезиращ ензим), успяват да установят, че ядрото получава хистаминергична инервация. Авторите допускат и възможността, хистаминът да коекзистира с друго невроактивно вещество, а именно аденозиндеаминаза (АДА). Тази възможност е потвърдена от съществуването на АДА-съдържащи перицелуларни арборизации, които са твърде сходни с картината на хистамин-имунореактивните, перисоматично разположени влакна в Me5 (Nagi et al., 1986; Iamamoto et al., 1988). Впоследствие една група от холандски изследователи, начело с Van Willigen стартира серия от имуноцитохимични експерименти с цел да разкрие невротрансмитерите и източниците на синаптичните връзки в Me5. Като резултат те установяват, че Me5 на плъх получава директна допаминергична (Coprav et al., 1990a) и серотонинергична (Coprav et al., 1991) инервация. Техните находки навеждат на мисълта, че тези класически трансмитери, поне у плъх, не играят ролята на медиатори, а са по-скоро невромодулатори в провеждането на дълбоката сетивност от главата. По-късно, същата работна група описва разпределението на синаптичните бутони на ултраструктурно ниво, а така също така и невротрансмитерното и невропептидно съдържание на различните бутонни типове в ядрото (Liem et al., 1992). Последващи проучвания изясняват до голяма степен и източниците на моноаминергичните синаптични контакти (Liem et al., 1993; Liem and Coprav, 1996; Liem et al., 1997). Изследователите тестват и голям брой невропептиди, без да успеят да докажат имунореактивност към нито един от тях в клетъчните тела на мезенцефалните тригеминални неврони (Coprav et al., 1990b). Според авторите, единственият кандидат за невромедиатор в някои първични аферентни неврони от Me5 на плъх е глутаминовата киселина (глутамат) и с по-малка вероятност сходната аминокиселина аспартат, а невропептидите действат

като модулатори на друг класически, коекзистиращ, но все още непознат невротрансмитер. В подкрепа на това предположение са предоставените от Chandler (1989) физиологични доказателства за наличие на възбудна аминокиселинна трансмисия между аференции от Me5 и тригеминалните мотоневрони. Други изследователи са се опитвали с променлив успех да локализируют в клетките на Me5 различни класически и неuropeптидни невротрансмитери. В имуноцитохимично изследване върху Me5 в заек, Kolta и съавт. (1993) визуализират серотонинергичната инервация на неговите неврони. По-рано същите автори, в търсене на възможните невротрансмитери, отговорни за инхибирането на тригеминалните първични аференции установяват, че Me5 се инервира от влакна, които съдържат гама-аминомаслена киселина (ГАМК) (Kolta et al., 1991a,b). ГАМК-ергичните терминали от Р-тип, пресинаптични на мезенцефалните периодонтални аференции, са установени в котка от Вае и съавтори (1997). ГАМК-имунореактивни неврони са доказани и в Me5 на плъх (Ginestal and Matute, 1993; Lazarov and Dandov, 2000). В пълна противоположност на данните за бозайници, Scott и сътр. (1994) установяват отсъствие на ГАМК-имунореактивност в мезенцефалните тригеминални неврони в птици. В същото време те докладват експресия на някои неuropeптиди и различни калций-свързващи протеини като калбиндин Д28к, парвалбумин, карбоанхидраза и S-100 протеин в същите клетки. Авторите изследват и редица пептиди в Me5, но съобщават за наличие само на субстанция Р (SP) и холецистокинин-имунореактивни невронални перикариони и отсъствие на имунореактивност в клетъчните тела за мет-енкефалин, неuropeпид Y (NPY), калцитонин ген-родствен пептид (CGRP), вазоактивен интестинален пептид (VIP) и соматостатин. В единственото проучване на пептидергичната инервация на Me5 в котка, което сме срещнали в съществуващата литература, Tashiro и др. (1989) не визират неuropeптидна имунореактивност в невроналните клетъчни тела на мезенцефалните тригеминални неврони, но отбелязват, че техни профили са в директен контакт с енкефалин-, субстанция П- и серотонин-съдържащи аксонални варикозитети.

Като се има предвид наличието на голям набор от невропептиди в клетките на ТГ, твърде е изненадващо отсъствието им в морфологично хомоложните им неврони в Me5. Очевиден е фактът, че отсъствието или наличието на даден невропептид в две ясно разграничени популации тригеминални първични аферентни неврони се асоциира с различни сетивни модалности, в които пептидът участва. Този феномен, обаче, се наблюдава единствено и само когато невроните на Me5 функционират в нормални условия. Независимо от факта, че интактните неврони на Me5 не експресират невропептиди в перикарионите си, тяхната функция до голяма степен се влияе от различни синаптични връзки и невротрансмитери, достигащи до тях. В тази връзка и в съответствие с интензивната невропептидергична инервация на ядрото, върху телата на мезенцефалните неврони са установени рецептори за много от тях (обобщени от Lazarov, 2002, 2007). Според Sorgray и сътр. (1990b), твърде е възможно синаптичните контакти върху клетките на Me5 да повлияват единствено и само невроналната активност, експресирана в централните и периферните им терминали, и то по непряк начин и след по-дълъг период от време. Авторите считат, че този факт показва наличието и участието на рецепторни системи, които не са пряко свързани с йонни канали, а по-скоро функционират чрез далеч по-бавни биохимични каскади, отключвани от вторични молекули-посредници. Често се изтъква, че при определени условия невроните на Me5 могат да функционират като такива с традиционни функции, по типа „интеграция и възбуждение“, освен като типични сетивни неврони, които принципно са лишени от синаптични контакти по повърхността на клетъчните си тела и не произвеждат непрекъснати акционни потенциали (Del Negro and Chandler, 1997).

6. Структурна пластичност на Me5 след периферна увреда

Независимо от сравнително изяснения нормален невротрансмитерен фенотип на мезенцефалните тригеминални неврони, все още съществуват съществени липси в подробното познаване на неврохимичната характеристика на тези неврони в условията на променена околна среда. Известен брой изследвания в близкото

минало доказват, че предизвиканите травми на периферните израстъци на първичните сетивни неврони могат да доведат до дегенерация на централните им израстъци. Този вид дегенерация, наречена транс-ганглионарна дегенерация (Grant et al. 1970), е най-подробно проучена при тригеминални и спинални първични сетивни неврони на плъх, както на светлинно-, така и на електронномикроскопско ниво (Aldskogius et al., 1985; Arvidsson, 1986; Castro-Lopez et al., 1990). Доказано е също така, че при плъх прерязването на периферен нерв довежда до клетъчна загуба и смърт в засегнатия сетивен ганглии (Aldskogius and Arvidsson, 1978; Ygge and Aldskogius, 1984; Arvidsson et al., 1986; Schmalbruch, 1987). Въпреки това, до момента се оказва невъзможно да се докаже коя именно функционална категория неврони най-вече се засяга от клетъчна смърт след прерязването на периферния нерв.

Както вече описахме по-горе, Me5 представлява уникална популация от първични сетивни неврони с характерни клетъчни тела от псевдоуниполярна тип, разположени в ЦНС. Принципно се счита, че тези неврони провеждат нервни импулси от проприоцептивните рецептори в дъвкательните мускули, както и от рецепторите в периодонталния лигамент на зъбите (Brodal, 1981). Проучванията при плъх доказват, че невроните на Me5 изпращат колатерали, завършващи в супратригеминалното и тригеминалното моторно ядро, както и в латералните отдели на ретикуларната формация (Matesz, 1981; Rokx et al., 1986; Arvidsson and Raappana, 1989; Dessem and Taylor, 1989).

Проучванията в хронологичен ред върху морфологичните промени в Me5 след прерязване на периферните израстъци на невроните са все още твърде малко. Едно от малкото систематизирани изследвания относно реакцията на мезенцефалните тригеминални неврони след прерязване на периферен нерв (*n. massetericus*) при плъх е направено от Raappana и Arvidsson (1992). В него авторите правят количествен анализ на морфологичните промени в Me5 в хронологичен порядък и установяват, че отчетливи белези на клетъчна смърт и невронална дегенерация (изразяваща се светлинномикроскопски като хроматолиза) започват да се проявяват ипсилатерално още на седмия ден след интервенцията, стават особено

видими на 30 ден и достигат максимум два месеца след прерязването на нерва. Като цяло, резултатите от количествената част на това проучване показват, че прерязването на *n. massetericus* довежда до съществена загуба на неврони в Me5. Тази трактовка на резултатите се подкрепя от по-ранни ултраструктурни изследвания, демонстриращи наличието на дегенерация и некроза в невроните на Me5 след аксотомия (Imamoto, 1972). Независимо от това, точният мащаб на тази клетъчна загуба и смърт остава все още неизяснен, тъй като значителна част от невроните на Me5 остава незасегната след прерязването на *n. massetericus*. Във връзка с това, по-ранни изследвания са доказали, че както *m. temporalis*, така и *m. pterygoideus medialis* при плъх притежават мускулни вретена (Maier, 1979), въпреки че броят на невроните, които ги инервират, все още остава неизвестен. Друга зона на инервация от невроните на Me5 е периодонталния лигамент. Изчисленията от данни, получени при едно изследване при котка (Nomura and Mizuno, 1985), показват, че приблизително 30% от мезенцефалните тригеминални неврони инервират периодонталния лигамент на горните и долните зъби. Трасиращи изследвания при плъх са показали, че има наличие на периферни израстъци на невроните на Me5, както в долночелюстния (Jacquin et al., 1983), така и в горночелюстния клон (Gonzalo-Sanz and Insausti, 1980; Jacquin et al., 1983) на троичния нерв. Взети заедно, всички тези данни сочат, че действителната клетъчна загуба и смърт при невроните на Me5, засегнати от лезия на *n. massetericus*, е много по-значителна отколкото показват резултатите от тези проучвания. Подобна трактовка се подкрепя и от резултатите в отделни хистологични срезове, където се установява почти пълна липса на неврони от страната на увредата.

Последващите количествени изследвания, целящи преброяване на интактните и увредените клетки са правени след постоперативен период на преживяване от 60 дни. Логично е, когато се извършват тези преброявания, да се правят сравнения между ипси- и контралатералната страна на увредата (лезията) за получаване на достоверни резултати. В своето изследване Raappana и Arvidsson (1992) стигат до извода, че при групата животни, преживели 10 дни, не се регистрира отчетливо намаляване на невроналния брой от страната на невротомията, докато при тези,

преживели 20 и 30 дни, данните за клетъчна смърт са количествено почти идентични с тези при животни, преживели 60 дни след интервенцията. Въпреки че авторите подчертават, че материалът им от по-късите постоперативни периоди на преживяване е твърде малко, за да се правят статистически достоверни изводи, те смятат, че събитията, довеждащи до невронална загуба и смърт в Me5, основно се случват между 10 и 30 ден след лезията на периферния нерв. Подобни изводи са направени и от резултатите на по-ранни проучвания върху невроните на ТГ при плъх (Aldskogius and Arvidsson, 1978).

В допълнение на данни за клетъчна смърт, след периферна лезия в невроните на Me5 се регистрират и белези на хроматолиза и дегенеративна аргирофилия. Освен в тяхната популация, невронална дегенерация се наблюдава също така в супратригеминалното ядро, както и в ретикуларната формация, разположена по дорзомедиалната страна на *nucleus oralis spinalis n. trigemini*. При други изследвания върху плъх е доказано, че тези съседни на Me5 зони получават колатерали от централните израстъци на невроните му (Matesz, 1981; Rokx et al., 1986; Arvidsson and Raappana, 1989; Dessem and Taylor, 1989; Luo et al., 1989). Ето защо аргирофилията в тези участъци може да бъде счтена като белег на трансганглионарна дегенерация в невроните на Me5. Паралелни дегенеративни белези се наблюдават и в тригеминалното моторно ядро. Не може да се изключи и предположението, че аргирофилията, регистрирана в този регион на ЦНС може да е в разклонения на тригеминални моторни неврони, тъй като те също се засягат от прерязването на *n. massetericus*. По-ранни проучвания при плъх обаче доказват, че невроните на Me5 изпращат колатерали в тригеминалното моторно ядро (Matesz, 1981; Rokx et al., 1986; Dessem and Taylor, 1989). Следователно, твърде е вероятно поне някои от дегенеративните профили измежду невроните на тригеминалното моторно ядро да представляват примери на трансганглионарна дегенерация в разклонения на мезенцефални тригеминални неврони.

Досегашните функционални изследвания доказват, че невроните на Me5 се асоциират с проприорецепторите на дъвкателните мускули и функционално кореспондиращите рецептори в периодонталния лигамент (Pfaffmann, 1939; Corbin

and Harrison, 1940; Jerge, 1963). Не може напълно да се изключи факта, че уникалното разположение на тези неврони вътре в ЦНС може по някакъв начин да играе важна роля за реакцията след лезия на периферен нерв. Твърде малко се знае и за реакцията на първичните проприоцептивни неврони, чиито клетъчни тела са локализиращи в гръбначномозъчните ганглии, след увреда на периферен нерв. Трябва да се подчертае, обаче, че едно физиологично проучване върху реинервацията на мускулните вретена след лезия на периферен нерв показва, че възстановяването на функцията на мускулните вретена далеч не е завършена дори и 18 седмици след предизвикване на травмата (Brown and Butler, 1976).

7. Неврохимична пластичност на Me5

От около две десетилетия се знае, че експресията на неuropeптидите може да бъде модулирана. Според Hökfelt и сътр. (1994) нивата на неuropeптидите могат да се понижават или да се повишават, вследствие на наранявания на периферните израстъци на първичните сетивни неврони, феномен формулиран като неврохимична пластичност. Първоначално Arvidsson и др. (1994) наблюдават, че след периферна аксотомия на *n. maxillaris* на троичния нерв, в Me5 се наблюдава *de novo* експресия на галанин (GAL) и неuropeптид Y (NPY), която при обичайни условия липсва. Изследванията, паралелно проведени от Umemoto и сътр. (1994), а впоследствие и от Wasikaka и др. (1996) също потвърждават пластичността на мезенцефалните тригеминални неврони. Въпросът, на който все още се търси конкретен отговор се отнася до ролята на новосинтезираните протеини като невротрофични фактори при регенерацията на аксотомияните неврони или тяхното евентуално участие в синаптичната трансмисия при увреда на периферните нерви.

Изследователският интерес към невроактивните пептиди достигна нов връх в последните десетилетия, когато се установи, че промените в условията на заобикалящата среда, такива като периферна нервна аксотомия, предизвикват съществени съпътстващи динамични промени в неврохимичното съдържание на увредените първични сетивни неврони, т.е. те проявяват забележителна

неврохимична пластичност. В средата на 90-те години на миналия век много лаборатории отделят голямо внимание на този проблем. Предишните изследвания вече са установили, че уврежданията на периферните клончета на първичните сетивни неврони водят до дегенерация на техните сетивни разклонения, известна като трансганглионарна дегенерация (Grant et al., 1970). Експериментите на Раарана и Arvidsson (1992) показват, че мезенцефалните тригеминални неврони с проприоцептивна функция са твърде чувствителни към нараняване на периферните нерви и реагират със значителна клетъчна загуба и трансганглионарна дегенерация. Последвалите проучвания успяват да установят, че прерязването на *n. massetericus* в плъхове индуцира забележимо увеличение в експресията на някои невропептиди като GAL, NPY, калцитонин-ген родствен пептид (CGRP) и препротахикинин, както и на кореспондиращите им информационни РНК (Arvidsson et al., 1994; Umemoto et al., 1994; Yoshida et al., 1995) в невроните на Me5. Намерено е, че периферното прерязване на нерва рефлектира в синтеза *de novo* на хипофизарен аденилатциклаза-активиращ полипептид – един от членовете на голямото семейство на VIP (вазоактивен интестинален пептид) пептидите (Larsen et al., 1997). В същото време интравенозното прилагане на аналгетик от групата на ендогенните опиоиди като клонидин, предизвиква снижение на и без това незначителната имунореактивност към мет-енкефалин в Me5 на котка (Vázquez et al., 1998). По подобен начин реагират на периферната аксотомия мезенцефалните тригеминални неврони в плъх, но отговорът им на увреда се манифестира с драстично намаление на някои маркери на първичните проприоцептори като калций-свързващите протеини парвалбумин и калбиндин (Wakisaka et al., 1996e). Парвалбумин- и калбиндин-съдържащи неврони са намерени в Me5 на плъх при нормални условия (Celio, 1990). Нещо повече някои изследователи като Ichikawa и Sugimoto (1999), Ichikawa и сътр. (1999, 2000) докладват за множествена застъпеност на парвалбумин с други калций-свързващи протеини като остеокалцин, остеопонтин и пептид 19, един антагонист на калмодулина, в практически всички неврони на Me5 в плъх.

8. Състояние на проблема

Направеният преглед на литературата очертава общата представа за Me5 като уникално мозъчно ядро, изградено от функционално хомогенна популация проприоцептивни неврони. Мнозинството от тях са големи по размери псевдоуниполярни клетки, с преобладаваща локализация в ростралната част на моста и лонгитудинално разположение по цялото протежение на средния мозък. Многобройни електрофизиологични и неврохимични изследвания са изяснили неврохимичния профил на мезенцефалните тригеминални неврони в различни бозайници, вкл. плъх при нормални околни условия (обобщени в Lazarov 2002, 2007). Той се характеризира с наличие на възбудни (основно глутамат) и задръжни (ГАМК) класически трансмитери и техните кореспондиращи рецептори. Наред с тях мезенцефалните тригеминални неврони у котка и плъх произвеждат някои атипични медиатори (азотен оксид) и калций-свързващи протеини (Lazarov and Dandov, 1998; Lazarov et al., 1998; Stoyanova and Lazarov, 2005a). В допълнение, Me5 невроните получават по синаптичен път пептидергична и катехоламинергична инервация, но не експесират при обичайни обстоятелства никой от познатите доказани и/или предполагаеми невроактивни пептиди. Първоначалните данни убедително показват че морфологичният и неврохимичен фенотип на тези неврони не е статичен и те показват забележителна структурна и химична пластичност. При промяна на околните условия, напр. при увреда на периферните им израстъци, нивото на трансмитерните субстанции в техните перикариони се променя за да осигури динамика в синаптичната трансмисия и преживяване на увредените неврони в необичайната среда.

Ето защо настоящето изследване е опит да проследи в хронологичен порядък, да опише и систематизира регистрираните морфологични и химични адаптационни изменения в Me5 у плъх при периферна аксотомия.

Ш. Ц Е Л И З А Д А Ч И

Целта на настоящето изследване е да се установят и изучат морфологичните и неврохимични промени в мезенцефалното тригеминално ядро на плъх след експериментално прерязване на *n. massetericus*.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните основни **задачи**:

1. С помощта на класически хистологични оцветявания да се опише нормалната морфология и цитоархитектоника на интактно мезенцефално тригеминално ядро у плъх.
2. След експериментално едностранно прерязване на *n. massetericus* да бъдат установени и проследени в хронологичен порядък структурните адаптивни промени в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони.
3. Чрез хистохимично доказване на NADPH-диафоразна активност да се установи наличието на азотен оксид и промените в неговото съдържание на интактните и аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони.
4. Прилагайки имунохистохимични техники с помощта на антитела срещу глутамат, субстанция Р, калцитонин ген-свързан пептид, вазоактивен интестинален пептид, невропептид Y и галанин да се изследва променения неврохимичен фенотип на увредените неврони в Me5.
5. Да се проучи динамиката в клетъчния отговор на аксонална увреда у преживелите мезенцефални тригеминални неврони посредством имунохистохимични реакции за доказване на глутамат и някои невронални калций-свързващи протеини като парвалбумин и калбиндин.
6. Да се направи статистически анализ и оценка на документираните съпътстващи периферната нервна увреда промени в експресията на невроактивни вещества от мезенцефалните тригеминални неврони с оглед неврохимичната пластичност на проприоцептивната система в усто-лицевата област.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. Експериментални животни и оперативна интервенция

Експериментите в настоящето изследване са осъществени основно върху материал от нормотензивни плъхове, порода Wistar. Изследвани бяха общо 30 възрастни мъжки Wistar плъха с телесно тегло 180-300 g. Експерименталните животни бяха редовно наблюдавани да бъдат в добро здравословно състояние, да получават храна и вода *ad libitum*, и бяха обезпаразитявани от персонала на вивариума към Медицински университет – София.

Всички изследвания са проведени съгласно нормативната уредба за работа с експериментални животни в България и правилата за работа с тях на Комисията по етика на научните изследвания в Медицински университет – София (КЕНИМУС).

Плъхът е най-широко използваното лабораторно животно за биомедицински изследвания в цяла Европа поради: а) безпроблемното снабдяване с колонии, отглеждани специално за тази цел; б) етичните принципи и съпротивата от страна на организациите за защита правата на животните.



Wistar плъховете са линия, получена чрез кръстосване на плъхове албиноси, които принадлежат към видове *Rattus norvegicus*. Тази линия е специално разработена през 1906 година във Wistar институт (USA), за да послужи като животински модел за използване в биологични и медицински изследвания.

Експерименталните животни бяха разделени на две групи с равен брой (n = 15) във всяка от тях за проследяване на морфологичните промени и измененията в неврохимичното съдържание в ядрото. Всички животни от двете групи бяха подложени на едностранно прерязване на *n. massetericus*, докато контралатералната страна при 12 от тях беше оставяна интактна и служеше за негативна контрола. При три плъха от всяка група на срещуположната на аксотомията страна беше осъществена фалшива оперативна интервенция, състояща се само в срязване на кожата и меките тъкани, но без последващо хирургично прерязване на периферния нерв, и така третираната страна служеше за допълнителна контрола.

Под дълбока анестезия с кетамин (50 mg/kg т.т, i.m.) бе направен срез на кожата в областта на бузата, сухожилието на *m. masseter* беше прерязано близо до залавянето му за *arcus zygomaticus* и след отпрепарирание на *n. massetericus* той беше лигиран и прерязан. След това оперативната рана беше зашита в хирургични слоеве и животните бяха оставени да преживеят без последващо постоперативно третиране за предвидения срок от 7 до 56 дни.

След изтичане на съответния период, последващ оперативната интервенция, животните бяха повторно дълбоко анестезирани и перфузирани.

4.2. Хистологични техники

4.2.1 Вземане и подготвяне на материала

За светлинномикроскопските изследвания сме използвали материал от 30 възрастни нормотензивни Wistar плъхове. Експерименталните животни бяха повърхностно упоявани с етер, последвано от интраперитонеално инжектиране на тиопентал (40 mg/kg телесно тегло). След анестезията те бяха перфузирани през възходящата аорта, като каниюлата се въвеждаше през лявата камера на сърцето. Първоначално кръвоносната система се промиваше за около 5 минути с

0.05 М фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид (PBS) с рН 7.36. Веднага след промиването се пускаше системата с фиксатора, състоящ се от 4% параформалдехид (Merck) в 0.1 М фосфатен буфер (PB) за около 20 минути. След перфузията отпрепарирахме областта от *pons* и *mesencephalon* в която е локализирано ядрото. Оформените тъканни блокчета се оставяха през нощта за дофиксиране в същия фиксатор на 4°C. След фиксирането материалът се промиваше от остатъчното количество фиксатор до другия ден с чешмяна вода. Включването на материала в парафин налага неговото дехидратиране през възходяща редица от алкохоли, започвайки с поставянето му в 50% етанол за 2 h, след което късчето тъкан се прехвърля в 70% етанол до другия ден, последвано от 80% етанол за 2 h, 96% етанол – 2 пъти по 90 min, 100% етанол – 2 пъти по 60 min. Следващата стъпка включва просветляване на материала в кедрово масло в пеницилинови шишенца. Материалът престоява в кедрово масло, докато придобие кехлибарен цвят или докато потъне на дъното на шишенцето, което може да отнеме няколко дни. След двукратно промиване в ксилол (2 пъти по 20 min), той се включва в парафин. Тази процедура започва с поставяне в първи парафин за 1 h на 56°C в термостат, след което късчето тъкан се поставя във втори парафин за 2 h на 56°C и накрая следва включване на изследваният материал в парафиново блокче.

Рязането на парафиновите блокчета беше извършено с помощта на парафинов микротом Leica RM 2125 RTF при дебелина на срезове 7 µm, като серийните срезове се улавяха върху хром-желатинирани предметни стъкла.

4.2.2 Рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин

Този метод на оцветяване е най-разпространен в хистологичната практика, тъй като благодарение на подходящото съчетание на оцветителите, отнасящи се към две противоположни групи – основни и кисели бои, е възможно да се добие цялостна представа за микроскопския изглед на изследваната структура.

Оцветяването с хематоксилин-еозин сме приложили върху материал от всички изследвани от нас експериментални животни. Преди да пристъпим към самото оцветяване, срезове се депарафинираха чрез поставяне на предметните стъкла в кювета с ксилол (2 пъти по 10 min), последвано от низходяща редица от алкохоли, а именно: 100% етанол – 3 min, 96% етанол – 3 min, 80% етанол – 3 min, 70% етанол – 3 min, дестилирана вода – 5 min и се изплакват 2 пъти с чешмяна вода, след което срезове се прехвърляха в разтвор на хематоксилин за 5 min. След оцветяването с тази боя отново следва изплакване на срезове с чешмяна вода няколко пъти и поставяне на препаратите в кювета с леко затоплена дестилирана вода за 20 min в термостат на 37°C. Следва поставяне на срезове в разтвор на еозин за 4 min и отново изплакване 2-3 пъти с чешмяна вода. Еозинът лесно се отмива във вода и в спиртове с ниска концентрация, и затова препаратите се превеждат през тези течности бързо, като за кратко се потапят няколко пъти, и само в 96% етанол, а в 100% етанол може да се държат по 1-2 min. Следва просветляване в ксилол и включване в ентелан.

4.2.3 Оцветяване по Nissl

При оцветяването по метода на Nissl депарафинираните и доведени до вода срезове се прехвърлят в 0.5% разтвор на крезилвиолет (Cresyl violet, Merck) за 8-10 min. Следва тяхното изплакване в дестилирана вода за около 5 min, след което те бързо се диференцират в оцетнокисел спирт (96% етанол и няколко капки ледена оцетна киселина). Следва поставянето им в 96% етанол, обезводняване в 100% етанол, просветляване в ксилол и включване в ентелан.

4.2.4 Оцветяване с неутрално червено (Neutral red)

При хистологичното оцветяване с Neutral red депарафинираните и доведени до вода срезове се прехвърлят в 96% етанол за 20 min. Следва

изплакване в дестилирана вода и последващо оцветяване с 1% воден разтвор на Neutral red за 20 min. След оцветяването следва дехидратиране през възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан.

4.3 Хистохимични техники

Вземането на материала е решаващо за хистохимичното демонстриране на ензимната активност. Целта е много бърза имобилизация на ензимите. Най-бързо това става посредством перфузионната или имерсионна фиксация, но голяма част от ензимите се инактивират при този подход. Друг основен момент при хистохимичното демонстриране на ензимите в Me5 е рязането на материала. В нашите изследвания рязането на материала сме извършили на замразяващ микроскоп Reihert-Jung (Germany) при температура -22°C , като сме предпочели изготвянето на срезове с дебелина 30 μm .

4.3.1 Никотинамид аденин динуклеотид фосфат дехидрогеназа (диафораза) (NADPH-d)

За хистохимичното демонстриране на NADPH-d прилагаме техниката на Scherer-Singler и др. (1983). За целта сме използвали криостатни срезове с дебелина 30 μm , монтирани върху предметно стъкло. Подсушените на въздух срезове се промиват за 5 min с 0.01 M PBS и се инкубират в инкубираща среда в термостат при 37°C в продължение на 30 min. Инкубационната среда включва 20 mg Nitro-BT; 50 mg β -NADPH; 0.3% Triton X-100 (Merck), разтворени в 50 ml 0.1 M Tris/HCl с pH 7.56. Срезове се изплакват в дестилирана вода, обезводняват се във възходяща спиртна редица, просветляват се в ксилол и се включват в ентелан (Merck).

4.4 Имунохистохимични методи

4.4.1 Имунохистохимична процедура

При имунохистохимичните реакции в настоящето изследване беше прилагана авидин-биотин пероксидаза комплекс (АВС) техника, предложена от Hsu и сътр. (1981). Всички имунохистохимични реакции бяха извършени във влажна камера върху парафинови срезове с дебелина на срезовете 7 μm .

В тази група експерименти бяха използвани първични антисеруми/антитела, които бяха насочени срещу аминокиселини и невропептиди. Имунореакциите бяха визуализирани с видово-специфични биотинилирани вторични антисеруми (за детайли относно работните разреждания и източниците на антителата вж. таблица 1 и таблица 2). По-конкретно имунохистохимичните реакции бяха осъществени по следния начин:

1. Депарафиниране на парафиновите срезове и довеждането им до вода.
 - 1) ксилол III – 5 min
 - 2) ксилол II – 5 min
 - 3) ксилол I – 5 min
 - 4) абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
 - 5) 96% етилов алкохол – 2 min
 - 6) 80% етилов алкохол – 2 min
 - 7) 70% етилов алкохол – 2 min
 - 8) дестилирана вода I – 5 min
 - 9) дестилирана вода II – 5 min
2. Пермеабелизиране на срезовете с 0.01 M PBS, pH 7.36, съдържащ 0.3% Triton X-100 (Merck) трикратно по 5 min с цел подобряване на пенетрацията на антитялото при последваща инкубация.
 - Промиване на срезовете с 0.01 M PBS, pH 7.36, 3 x 5 min.

3. Инхибиране на ендогенната пероксидаза с 1.2% водороден пероксид в абсолютен метанол в продължение на 30 min на стайна температура с последващо 15 минутно промиване в 0.01 M PBS / 0.3% Triton X-100.
4. За редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване срезове бяха преинкубирани с 0.01 M PBS, съдържащ 5% нормален кози серум за 1 h на стайна температура.
5. Кратко двукратно промиване по 5 min с 0.01 M PBS / 0.3% Triton X-100.
6. Инкубация на срезове със съответните първични антисеруми в разреждания от 1:100 до 1:5000 (вж. таблица 1). Общото инкубационно време беше 48 h, от които 24 h на стайна температура и след това още 24 h в хладилник при 4°C.
7. Промиване на срезове с 0.01 M PBS, pH 7.36, 3 x 5 min.
8. Инкубация с второто (мостово) антитяло – биотинилиран антизаешки IgG, произведен в коза (производство на Sigma) или биотинилиран антикози IgG (Santa Cruz), произведен в заек в разреждане 1:250 с 0.01 M PBS.
9. Промиване на срезове с 0.01 M PBS (pH 7.36) 3 x 5 min.
10. Инкубация на срезове в ABC комплекса (Vector Laboratories). Инкубационният разтвор се приготвяше 30 min преди употреба като на 1ml 0.01 M PBS добавяхме 6.26 µl A и 6.26 µl B. Времето за инкубация беше 2 h във влажна камера на стайна температура.
11. Промиване на срезове с 0.01 M PBS 2 x 5 min.
12. Промиване на срезове с 0.05 M Tris/HCl буфер с pH 7.54 за 5 min.
13. Визуализиране на реакциите от 5 до 15 min на тъмно с помощта на 3,3'-диаминобензидин (DAB) като хромоген.
14. Кратко промиване с 0.05 M Tris/HCl буфер, изплакване в дестилирана вода, възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан (Merck), а именно:
 - 1) дестилирана вода – 5 min
 - 2) 70% етилов алкохол – 2 min

- 3) 80% етилов алкохол – 2 min
- 4) 96% етилов алкохол – 2 min
- 5) абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
- 6) ксилол 2x 10 min

4.4.2 Контрол и специфичност на антителата

За да тестваме специфичността на антителата, използвани в това проучване, използвахме положителни и отрицателни контроли. За тестване на специфичната имунореактивност сме провеждали паралелни реакции, при които сме изпускали специфичните първични антитела и сме ги заменяли в инкубационната смес или с PBS или с неимунен серум при същото разреждане като първичния антисерум. При тези условия, не установихме специфично имунооцветяване в инкубираните срезове. Антителата бяха допълнително характеризирани с тъкан от области, за които е известно, че съдържат изследваните антигени. Имунобелязани участъци от горния шиен ганглий и от различни области на мозъка на нивото на тригеминалния сетивен ядрен комплекс и на тригеминалния ганглий бяха използвани като позитивни контроли в нашите експерименти.

4.5 Обработка и анализ на изображенията

Препаратите бяха проучени и заснети с изследователски микроскоп Nikon, оборудван с цифрова камера DMX 1200с. Дигиталните снимки бяха записани в TIF-формат и обработвани за жустиране на яркостта и контраста, както и за отстраняване на налични артефакти, използвайки Adobe Photoshop CS3 софтуер (Adobe System, Inc, San Jose, CA).

ТАБЛИЦА 1. Списък на първичните антисеруми прилагани при имунохистохимичните реакции

Първични антисеруми Антиген	Каталожен номер	Производител	Гостоприемник / Тип	Разреж- дане
Глутамат (Glu)	G-6642	Sigma BioSciences	заек/поликлонално	1:5000
Субстанция P (SP)	8834033	INCSTAR	заек/поликлонално	1:1000
Невропептид Y (NPY)	RPN 1702	Amersham	заек/поликлонално	1:500
Калцитонин ген-родствен пептид (CGRP)	PEPA27	Serotec	заек/поликлонално	1:1000
Галанин (GAL)	PEPA31	Serotec	заек/поликлонално	1:1000
Калбиндин (CB)	C-8666	Sigma	мишка/моноклонално	1:1000
Парвалбумин (PV)	P-3171	Sigma	мишка/моноклонално	1:1000

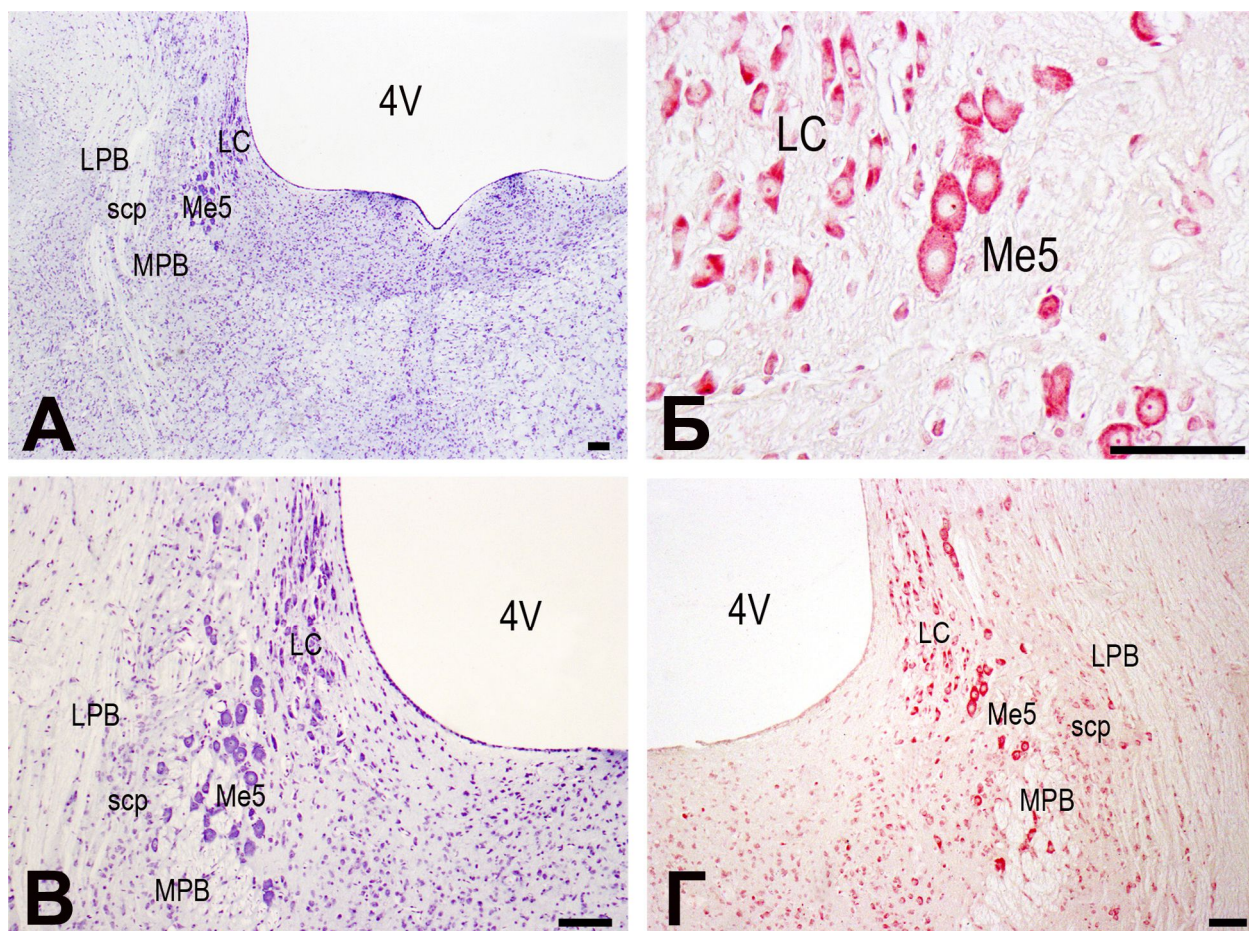
ТАБЛИЦА 2. Списък на вторичните антитела прилагани при имунохистохимичните реакции

Вторични антисеруми Реагент	Производител	Разреждане
Кози антизаешки IgG, биотинилиран	Sigma	1:250
Кози антимиши IgG, биотинилиран	Santa Cruz	1:250

V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

5.1. Локализация и нормална морфология на мезенцефалното тригеминално ядро

Мезенцефалното тригеминално ядро е билатерална надлъжна колона от около 1000-1500 неврона, разпростираща се у плъх върху дължина от 4-5 мм в роstralната част на моста и по цялото рoстрoкаудално прoтежение на средния мозък.



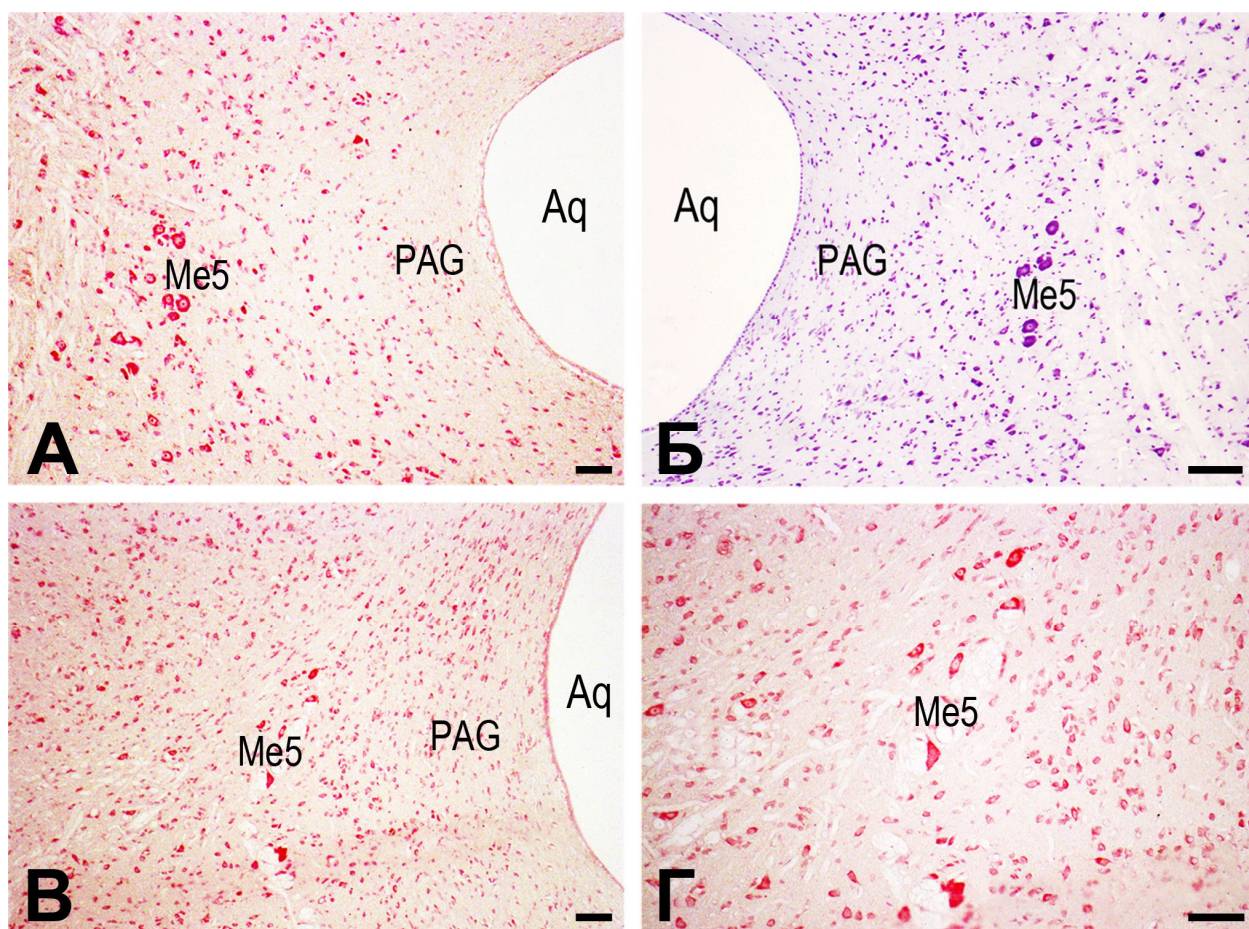
Фигура 5.1. Разположение на невроналната популация в каудалната част на Me5 у плъх. (A) Малко увеличение на ядрото на ниво мост, демонстриращо локализацията на Me5 неврони в близост до съседно разположените locus coeruleus (LC) и парабрахиялните ядра. (Б-Г) Срезове на ядрото оцветени с неутрално червено на голямо (Б) и малко увеличение (Г), и с крезил виолет (В), показващи разположението на перикарионите на Me5 неврони в агрегати между LC и медиалното парабрахиялно ядро (MPB). LPB, латерално парабрахиялно ядро; scp, pedunculus cerebellaris superior, 4V, ventriculus quartus. Мащабна скала = 50 μ m.

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

Преобладаващата част (60-80%) от мезенцефалните тригеминални неврони се разполагат в каудалната една трета на ядрото в моста и са концентрирани в групи от 2-9 клетки в триъгълника между *locus coeruleus* и медиалното парабрахиялно ядро (фиг. 5.1), обхващащи *pedunculus cerebellaris superior (brachium conjunctivum)*.

В роstralна посока на ниво среден мозък, разпръснатите мезенцефални тригеминални неврони се наблюдават като тънка, извита маргинална пластинка от перикарионни профили, ограждаща от латерално сивото мозъчно вещество, *substantia grisea centralis (periaqueductal gray)*, около *aqueductus cerebri* (фиг. 5.2).

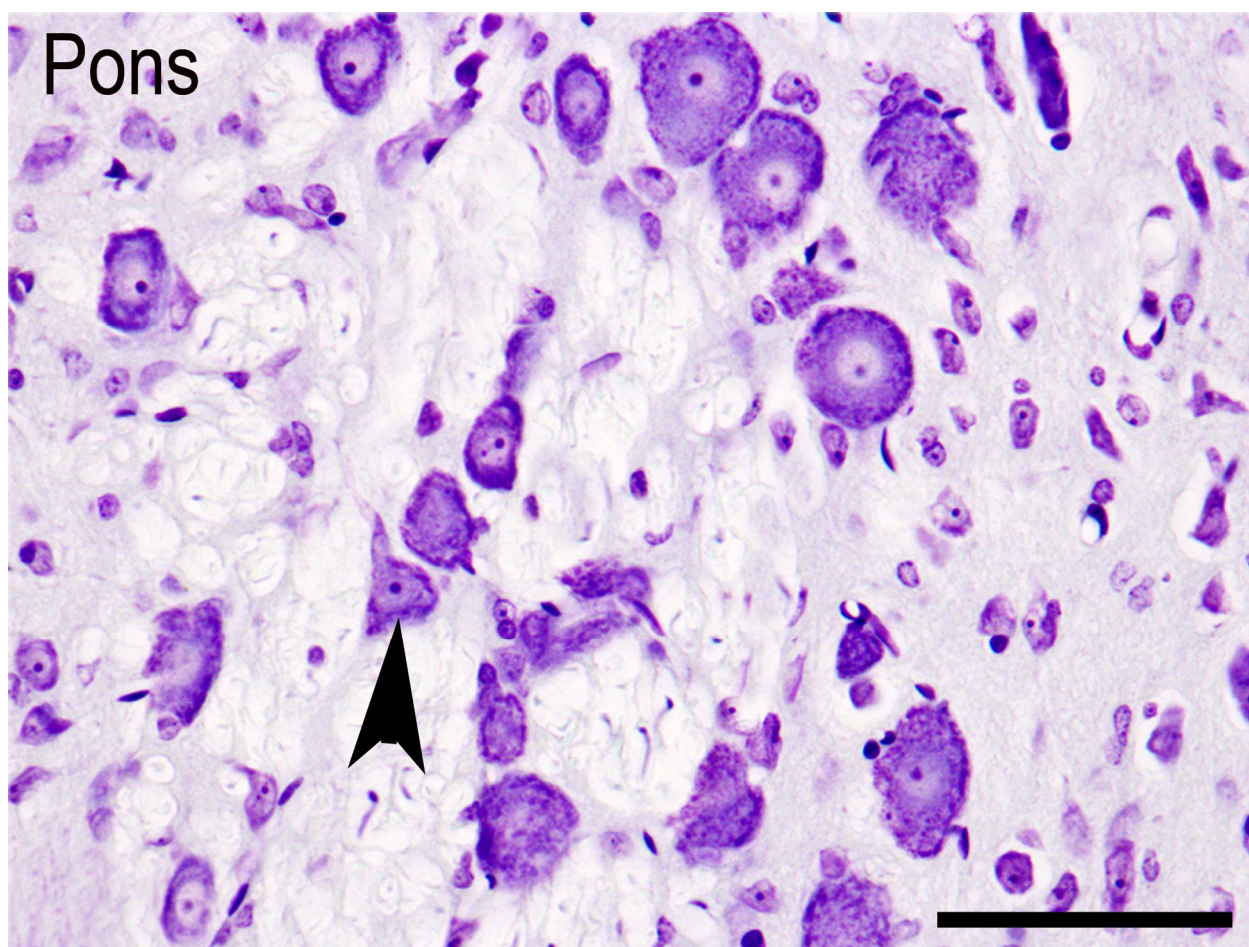


Фигура 5.2. Разположение на невроналната популация в роstralната част на Me5 у плъх. (A-B) Малко увеличение на ядрото на ниво среден мозък, показващо локализацията на мезенцефалните тригеминални неврони (Me5) латерално от сивото мозъчно вещество (PAG). (Г) По-голямо увеличение на мезенцефалната част на ядрото, посочено във (В), демонстриращо разпръснати профили на Me5 неврони. Aq, *aqueductus cerebri*. Оцветяване с неутрално червено (А, Б и Г) и кризил виолет (Б). Мащабна скала = 50 μ m.

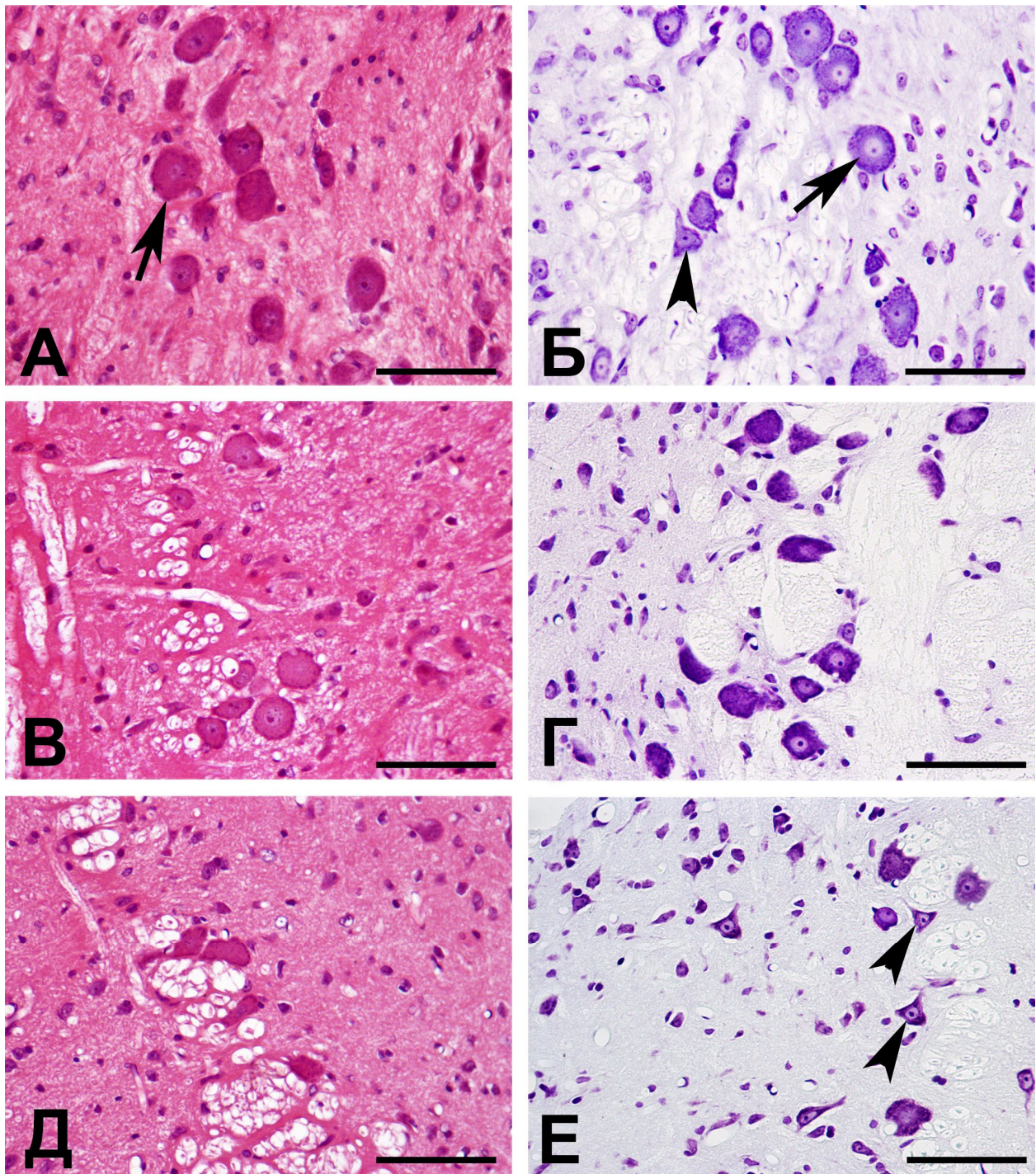
СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

Мезенцефалното тригеминално ядро у плъх е изградено от две ясно разграничими субпопулации от нервни клетки. Мнозинството от тях са големи, а малка част са малки сферични или овоидни псевдоуниполярни неврони (фиг. 5.4), които се наблюдават по цялата дължина на ядрото, на ниво мост, при преходната част между мост и среден мозък, и по протежение на последния на нивото на *colliculi caudales (inferiores)* и *colliculi craniales (superiores)*. В допълнение на тях, в каудалната мостова част на ядрото се наблюдават и изолирани малки, вретеновидни мултиполярни неврони (фиг. 5.3).



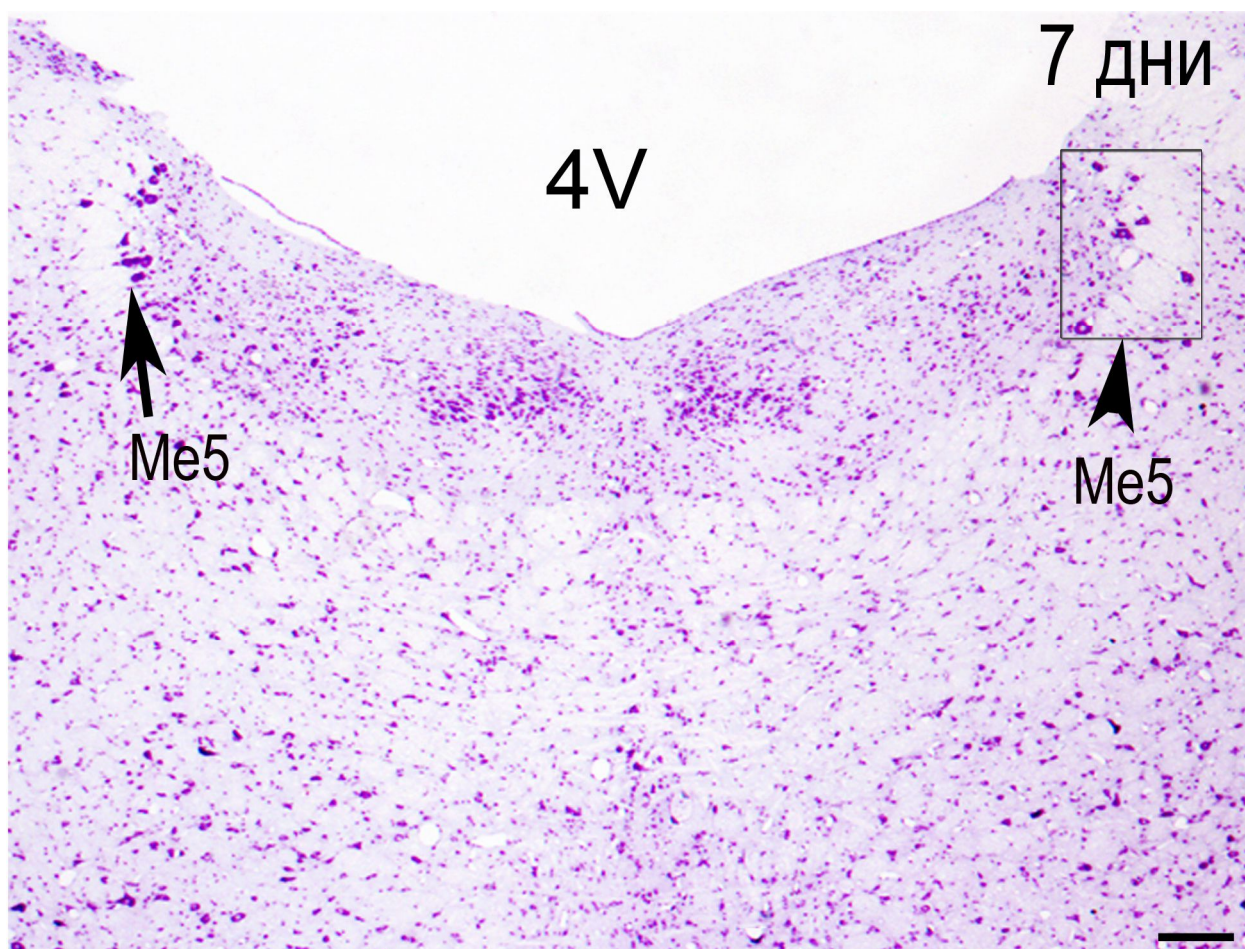
Фигура 5.3. Морфология на невралната популация на Me5 у плъх. В каудалната част на ядрото, разположена в моста, се забелязват единични малки профили на мезенцефални тригеминални неврони с мултиполярна морфология (глава на стрелка). Мащабна скала = 50 μ т.



Фигура 5.4. Морфология на невралната популация на мезенцефалните тригеминални неврони (Me5) у плъх след оцветяване с неутрално червено (А, В и Д) и крезил виолет (Б, Г и Е). Преобладаващата част от Me5 неврони по цялото протежение на ядрото са с големи и сферични клетъчни тела (стрелки), а малка част от тях са малки неврони с мултиполярни перикариони (глави на стрелки). Мащабна скала = 50 μ m.

5.2. Морфологични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия

След експериментално едностранно прерязване на *n. massetericus* и период на преживяване от 7 дни, мезенцефалните тригеминални неврони от страната на интервенцията показват незначително намаляване на техния брой, сравнен с този на контралатералните Me5 неврони от интактната мозъчна половина (фиг. 5.5). Подобна находка се регистрира по цялото протежение на ядрото, на ниво мост и среден мозък.

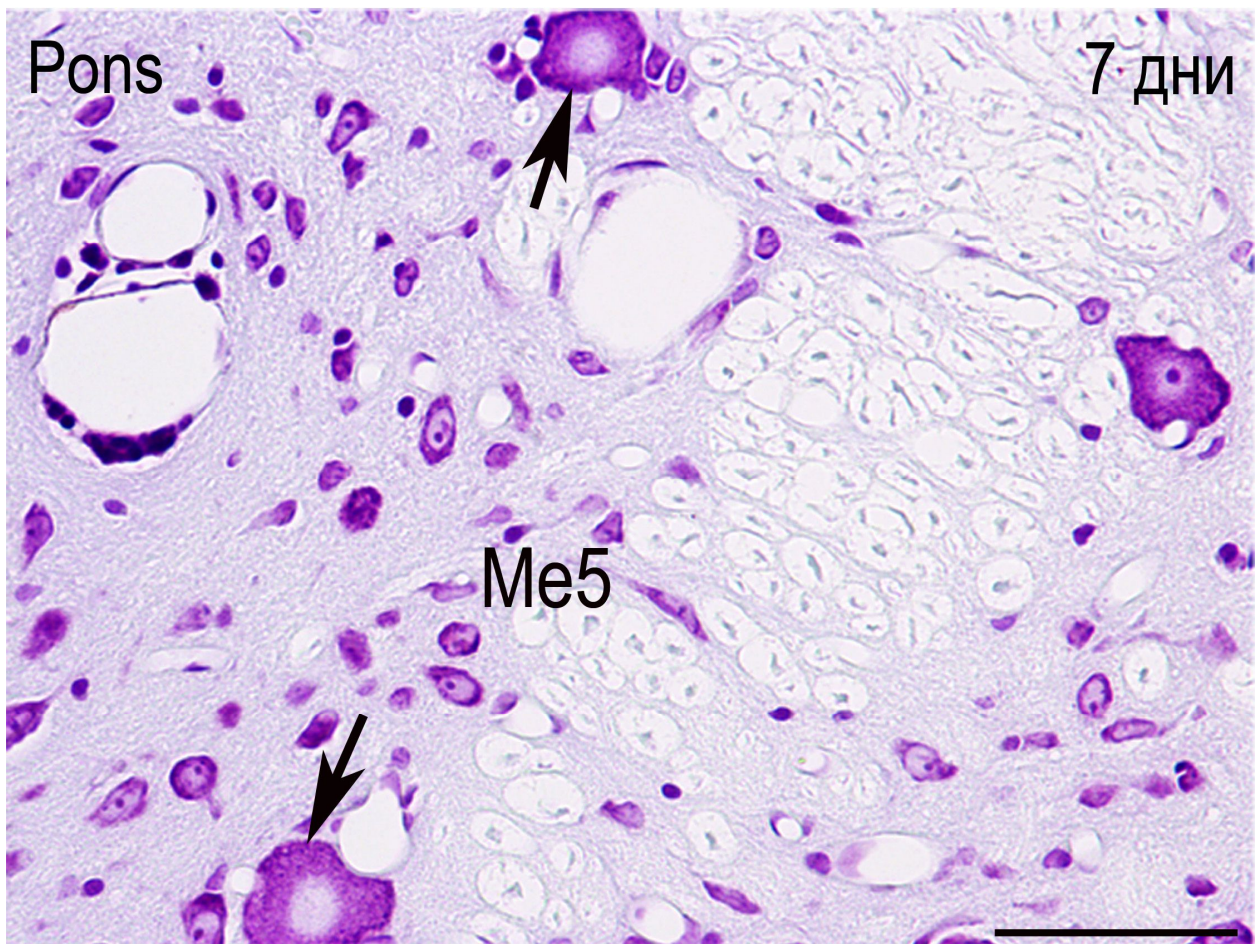


Фигура 5.5. Микрофотография през мостовата част на Me5 у плъх 7 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus*. Мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) числено са намалени незначително в сравнение с броя им на интактната мозъчна половина (стрелка). 4V, *ventriculus quartus*. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100 μ m.

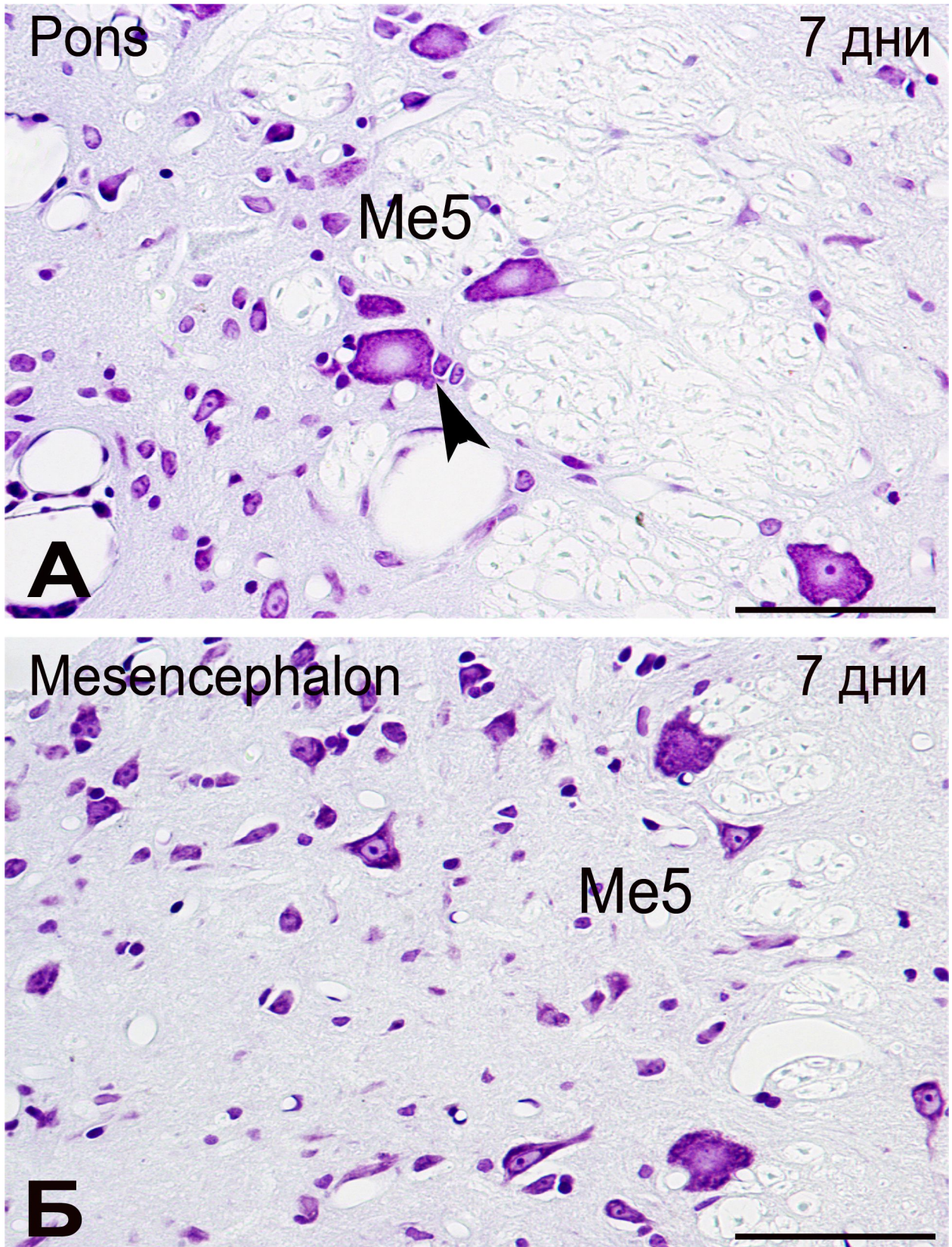
СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

В това време, на по-голямо увеличение на микроскопа се установяват първите морфологични прояви на хроматолиза в перикарионите на аксотомираните Me5 неврони. Хроматолитичните промени в ядрото са по-силно изразени в големите мезенцефални тригеминални неврони, в сравнение с проявите в по-малките псевдоуниполярни и мултиполярните Me5 неврони. Те засягат както клетъчното ядро, така и цитоплазмата и се изразяват в избледняване, а в някои неврони и пълно изчезване на базofilно оцветените Нислови гранулации в перикариона. Ядрата на увредените неврони се уголемяват и се изместват периферно, а кондензираният хроматин дезинтегрира и се деспирализира (фиг. 5.6).



Фигура 5.6. По-голямо увеличение на очертаната зона в предишната микрофотография, демонстриращо хроматолитичните промени в големите аксотомирани мезенцефални тригеминални невронални профили (стрелки). Седем дни след интервенцията се наблюдава начална дезинтеграция на Нисловата субстанция и хетерохроматина в ядрото. Оцветяване по Нисл с крезил виолет. Мащабна скала = 50 μ m.



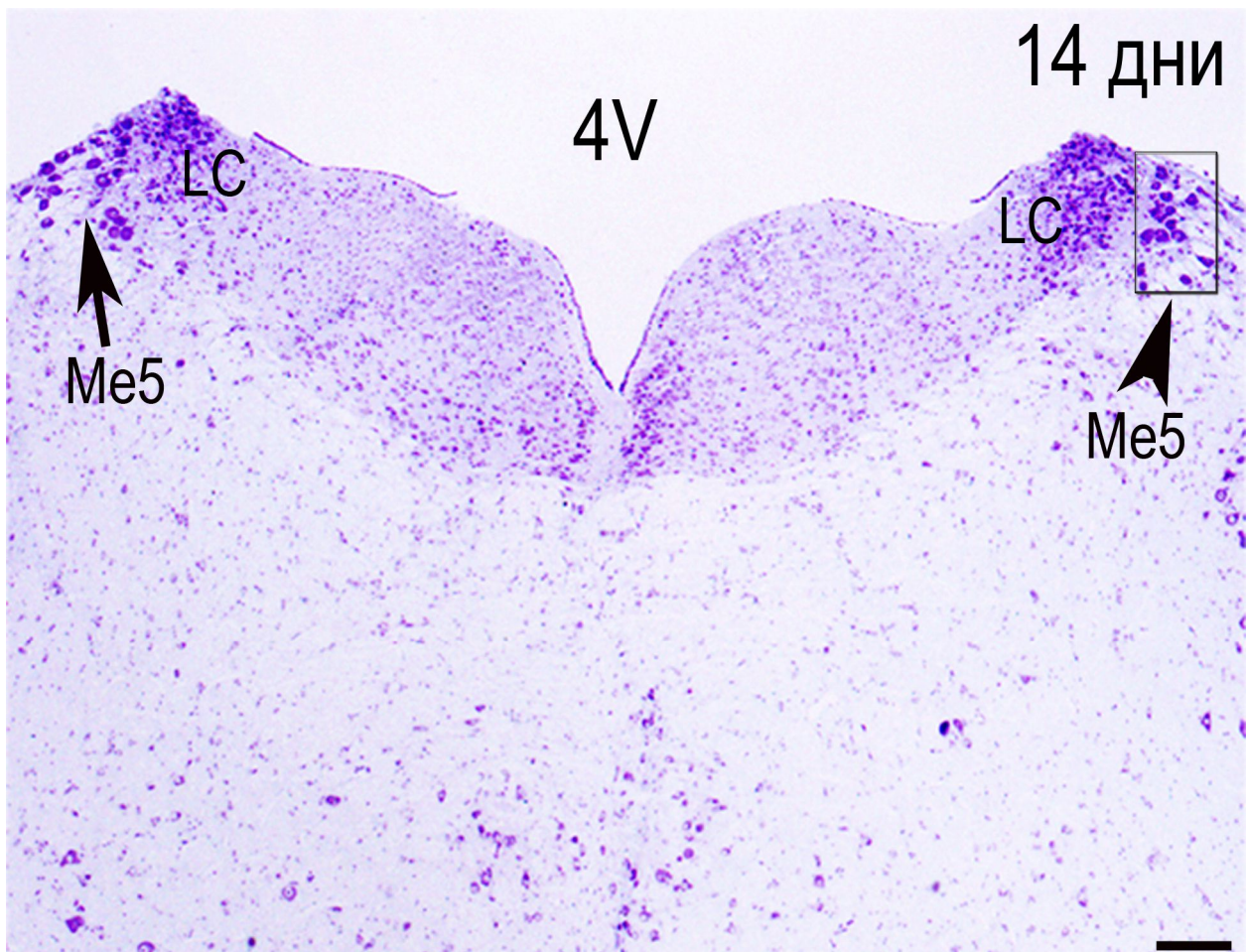
Фигура 5.7. Начална Валерова дегенерация в аксона (глава на стрелка) на аксотомиран мезенцефален тригеминален неврон в мостовата (А) и мезенцефална (Б) част на Me5 7 дни след периферна аксотомия. Оцветяване с кризил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μ m.

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

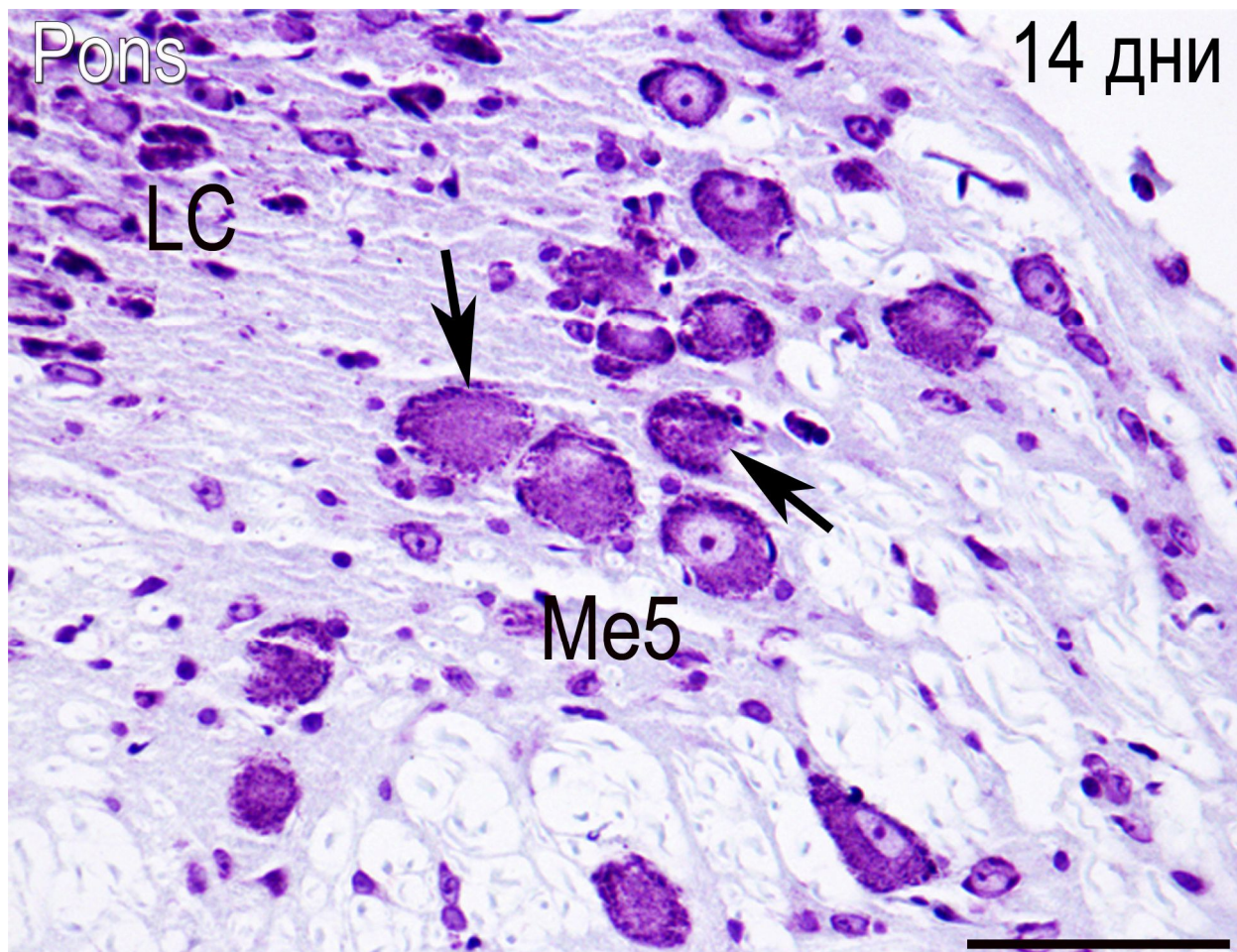
Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

Дегенеративни промени се наблюдават и в аксоналните израстъци дистално от мястото на прерязване на нерва. Те протичат по типа на т.нар. дегенерация на Waller и се манифестират с дезинтеграция на аксоналния скелет, нарушения в цялостта на аксолемата, а впоследствие и на миелиновата обвивка (фиг. 5.7).

Две седмици след аксотомията броят на засегнатите Me5 неврони от страната на нервното прерязване продължава да намалява в сравнение с ипсилатералната контролна страна (фиг. 5.8). По това време, наред с персистиращите и описани по-горе морфологични клетъчни промени, в перикарионите на увредените мезенцефални тригеминални неврони могат да бъдат наблюдавани базофилни грануляции и дегенеративни профили (фиг. 5.9).



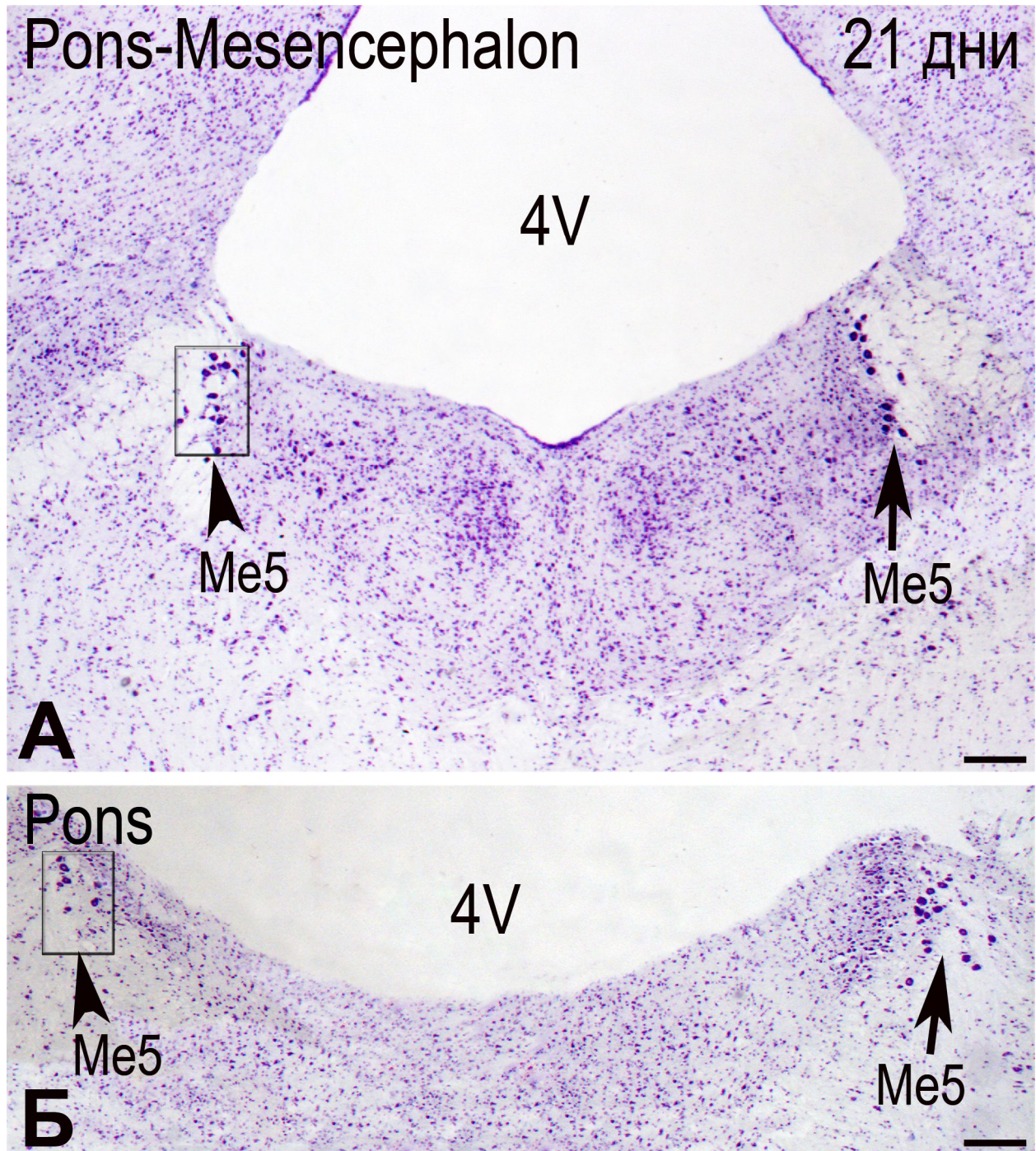
Фигура 5.8. Микрофотография от каудалната част на Me5 у плъх 14 дни след едностранно прерязване на *p. massetericus*. Броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) е редуциран в сравнение с броя им на интактната (стрелка) мозъчна половина. LC, locus coeruleus; 4V, ventriculus quartus. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100 μ m.



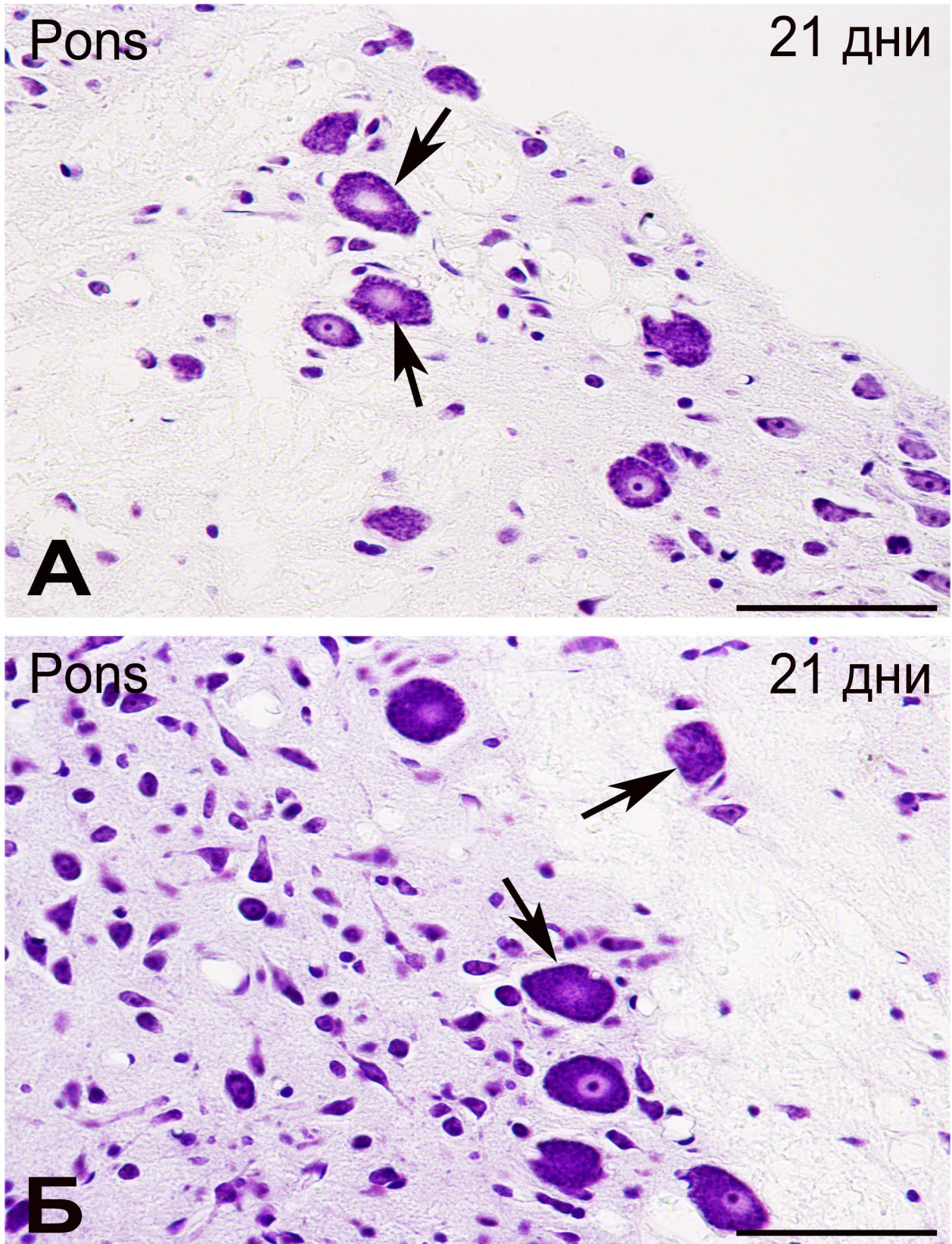
Фигура 5.9. По-голямо увеличение на очертания правоъгълник от предходната микрофотография, демонстриращо хроматолитичните промени на този етап в аксотомираните Me5 неврони. Обърнете внимание на наличието на базофилни грануляции в дегенериралите невронални профили (стрелки). LC, locus coeruleus. Оцветяване с крезл виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μ m.

След период на преживяване 21 дни, редуцираните по брой Me5 неврони на ниво мост от страната на аксоналната увреда са ясно забележими – броят на аксотомираните неврони е значително по-малък, в сравнение с този на интактните неврони на контролната страна (фиг. 5.10). Техните клетъчни тела, независимо от размера и формата им, показват всички белези на невронална дегенерация (фиг. 5.11). Подобна картина се установява и на по-рострално ниво на ядрото в средния мозък – броят на аксотомираните Me5 неврони е видимо по-малък, сравнен с броя на интактните такива (фиг. 5.12). Увредените мезенцефални тригеминални неврони

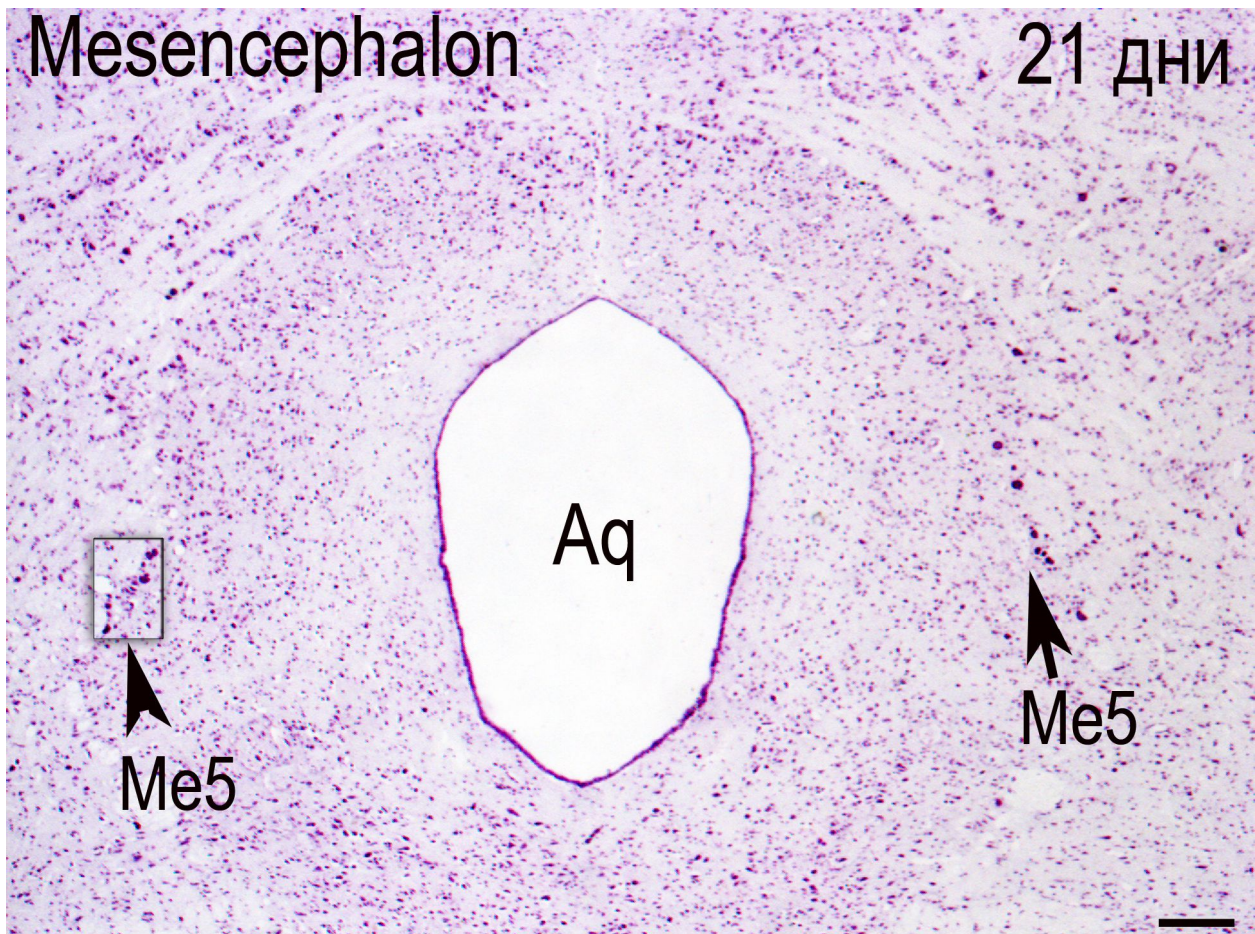
показват белезите на трансневронална дегенерация с поява на хроматолитични гранули и диспергиране на ядрения хроматин (фиг. 5.13).



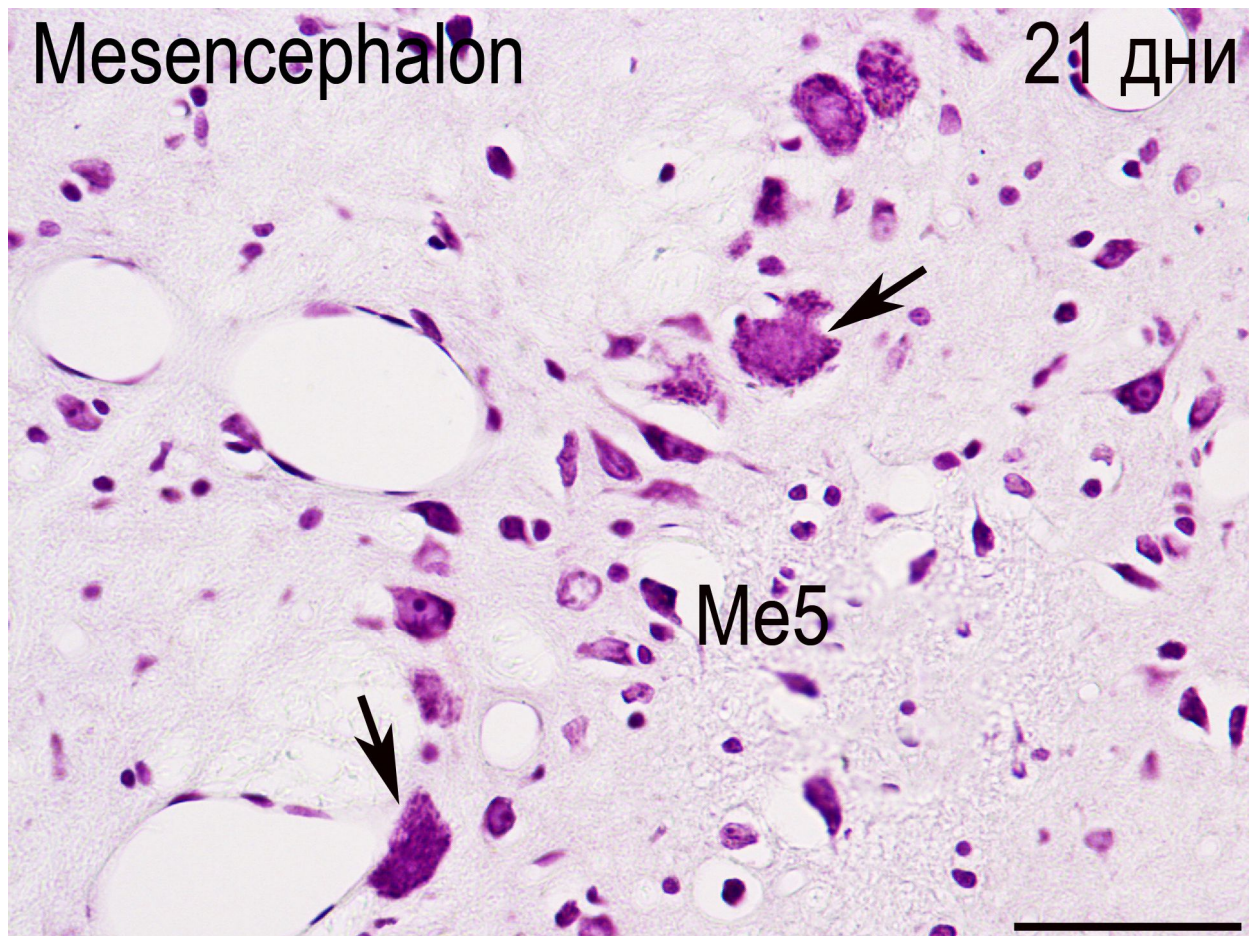
Фигура 5.10. (А, Б) Микрофотографии от преходната мост-среден мозък (А) и мостова (Б) части на Me5 у плъх 21 дни след едностранна аксотомия на *p. massetericus*. Броят на аксотомираните Me5 неврони (глави на стрелка) е видимо намален в сравнение с този на интактните неврони (стрелки). 4V, *ventriculus quartus*. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100 μ m.



Фигура 5.11. (А) По-голямо увеличение на очертания правоъгълник от фиг. 5.10А, и друга зона от мостовата част на Me5 у плъх (Б), показващи дегенерирани Me5 неврони (стрелки) 21 дни след едностранна аксотомия. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μ т.

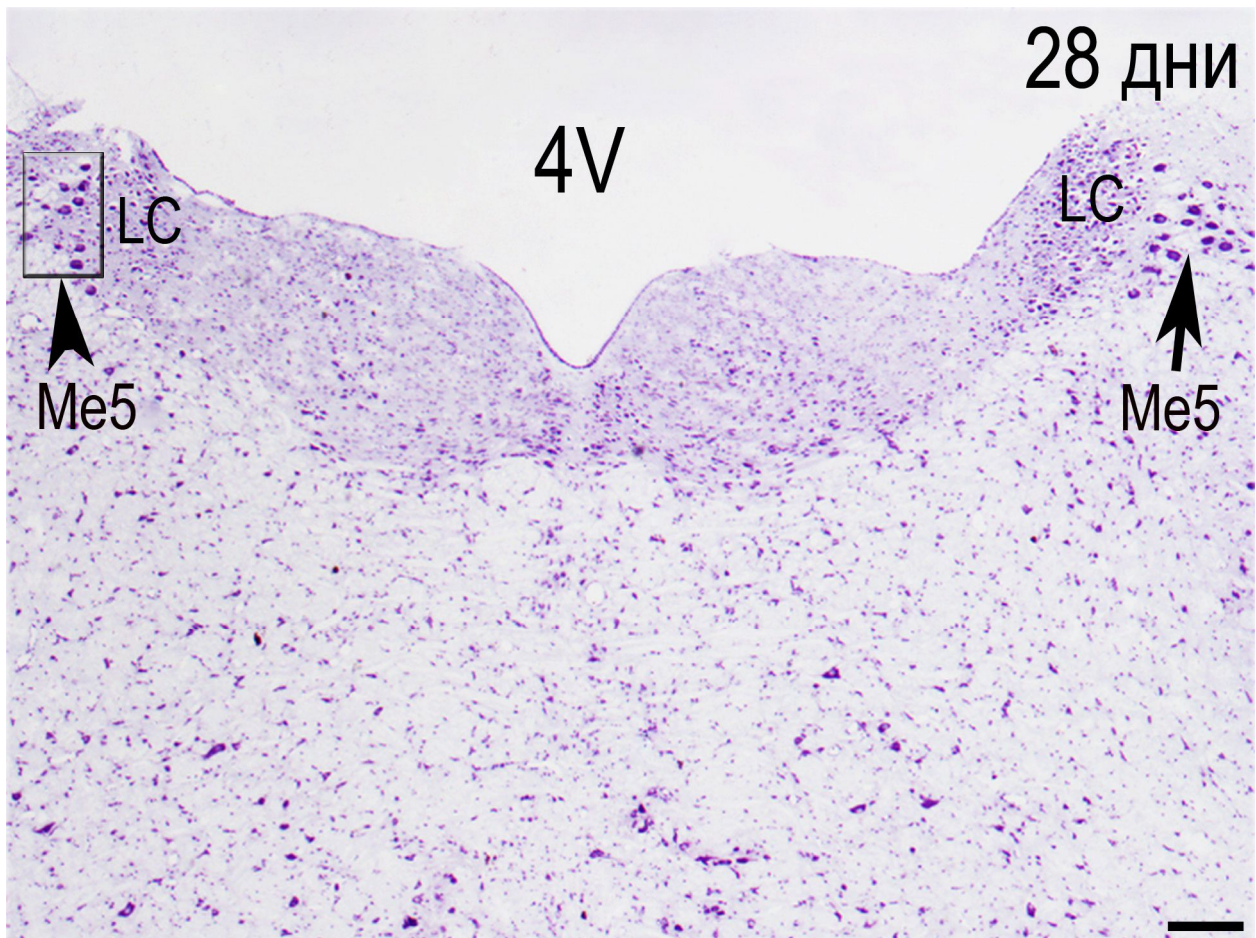


Фигура 5.12. Микрофотография от средномозъчната част на Me5 у плъх 21 дни след едностранна аксотомия на *p. massetericus*. Ясно се забелязва редуцирания брой на аксомираните Me5 неврони (глави на стрелка) в сравнение с този на невроните от интактната мозъчна страна (стрелки). Aq, *aqueductus cerebri*. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100 μ m.

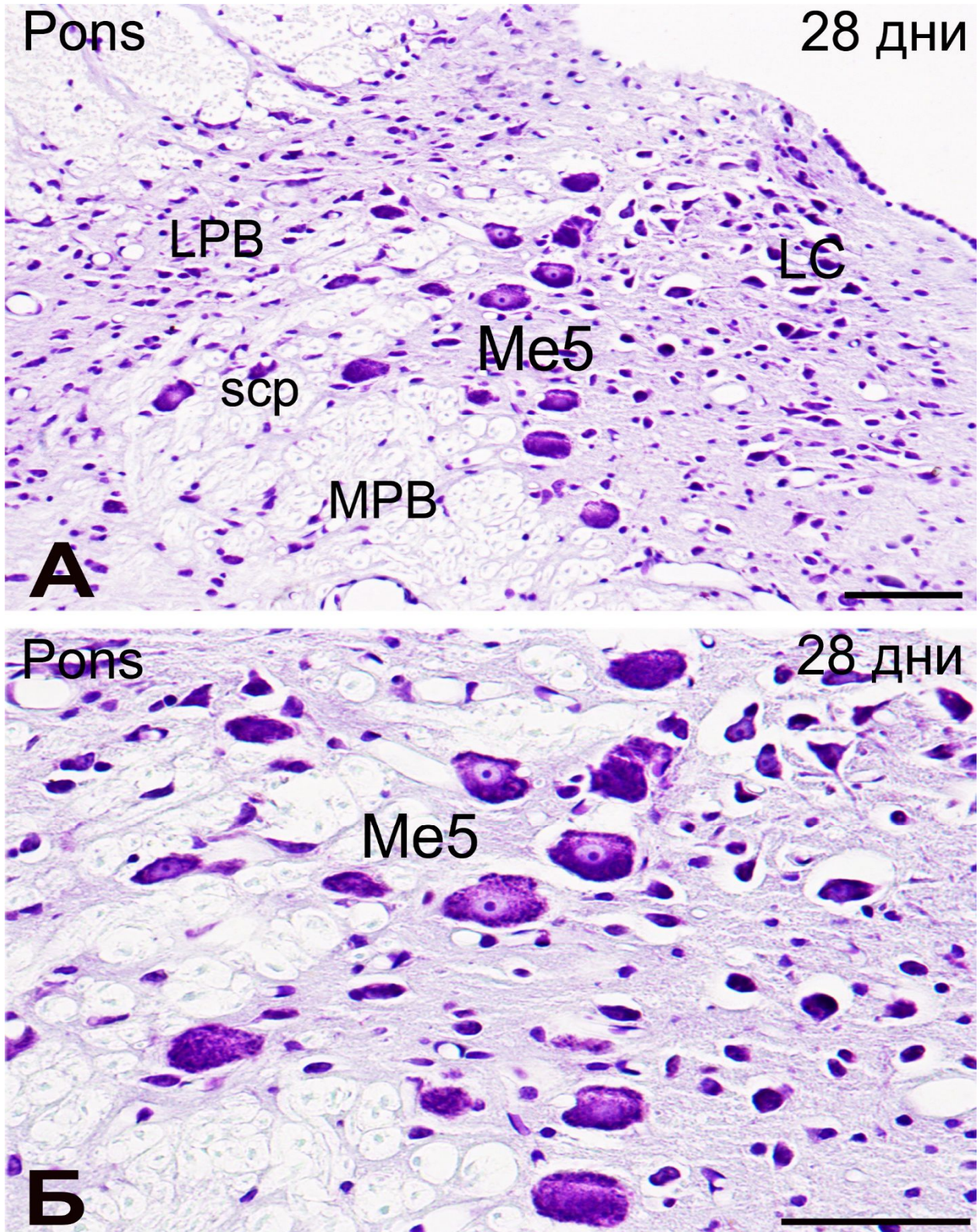


Фигура 5.13 По-голямото увеличение на очертавания правоъгълник от предходната фигура ясно демонстрира увредени Me5 неврони (стрелки) с белези на транснеуронална дегенерация 21 дни след едностранна аксотомия. Оцветяване с кризил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μ m.

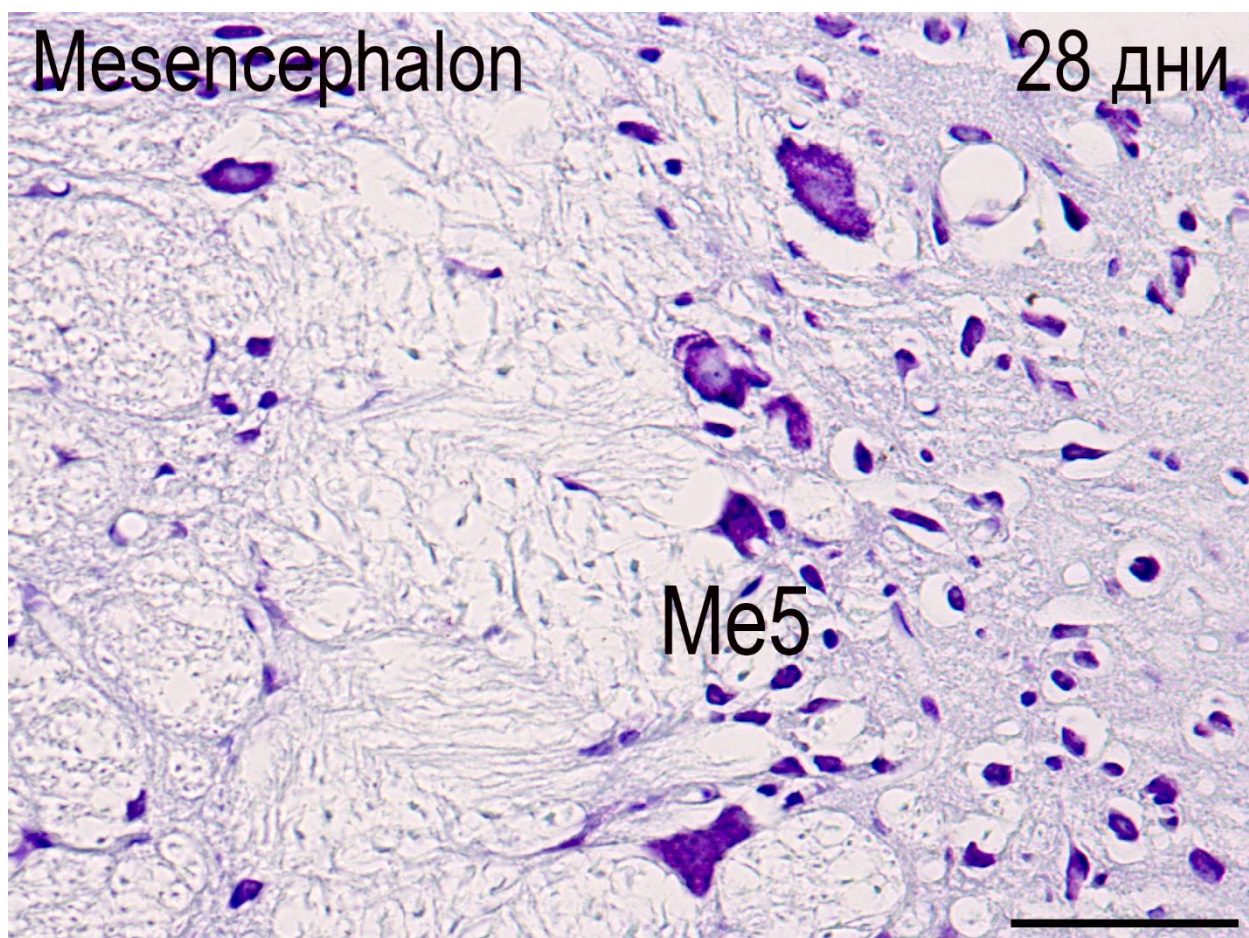
На 28-ия ден след оперативната интервенция, на аксотомираната страна на ядрото на ниво мост все още може да бъде регистриран значителен спад в броя на мезенцефалните тригеминални неврони, който е по-голям от наблюдавания брой увредени неврони на 7-ия постоперативен ден и от този, наблюдаван на нетретирания контролна мозъчна половина (фиг. 5.14). В същото време, нивото на невронална дегенерация е леко понижено (фиг. 5.15), но описаната находка е налице все още в последващите дни след интервенцията. Описаните морфологични промени не показват забележими субективни различия между невроните, разположени в каудалната и ростралната част (фиг. 5.16) на ядрото.



Фигура 5.14. Микрофотография на малко увеличение от каудалната част на Me5 у плъх 28 дни след едностранно прерязване на *p. massetericus*. Броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) е по-малък от този на невроните от интактната мозъчна половина (стрелка). LC, locus coeruleus; 4V, ventriculus quartus. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100 μ m.

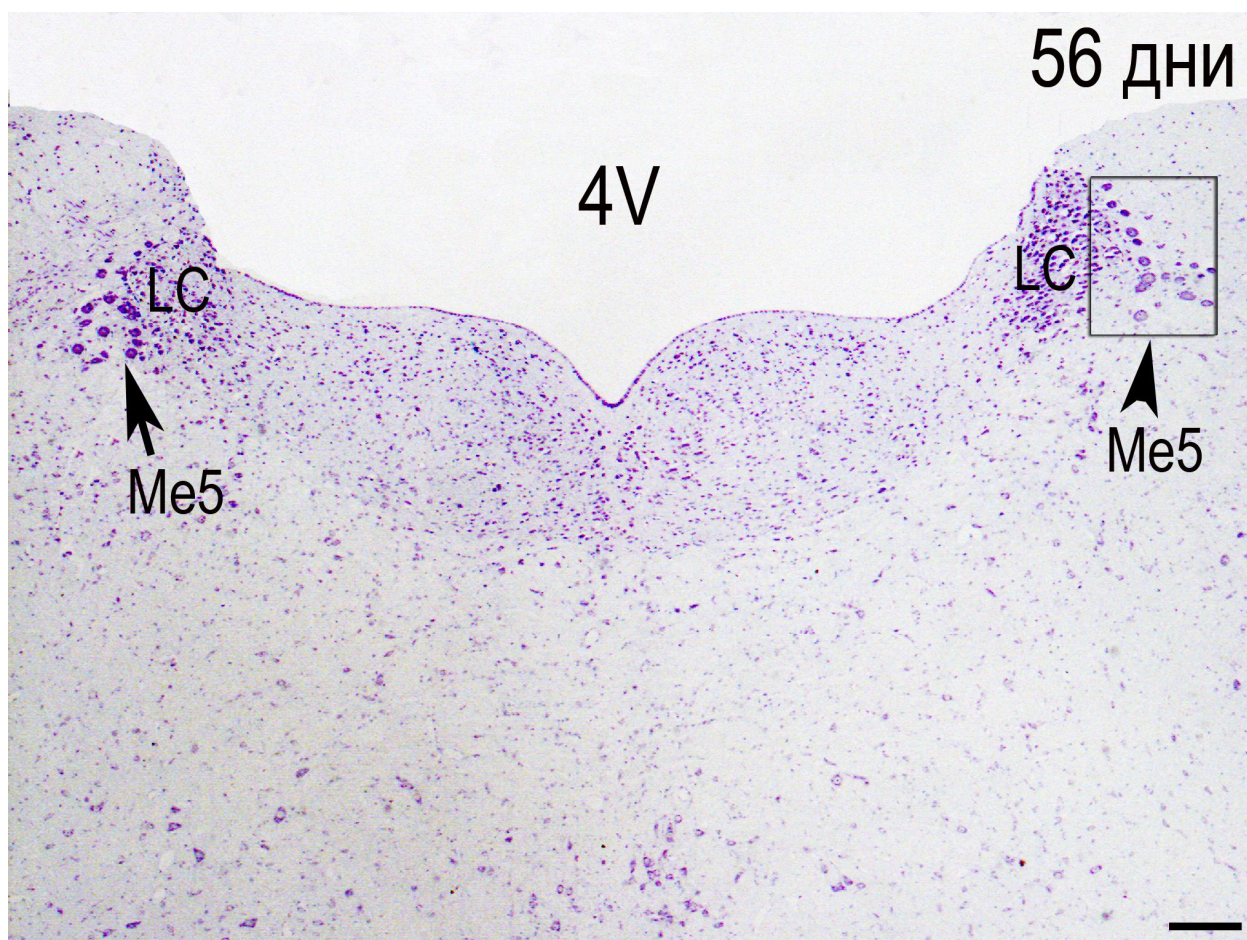


Фигура 5.15. (А, Б) По-големи увеличения на очертаната зона в предишната микрофотография, демонстриращи хроматолитичните промени в големите аксотомирани мезенцефални тригеминални невронални профили (Me5). LC, locus coeruleus; MPB, медиално парабрахиялно ядро; LPB, латерално парабрахиялно ядро; scr, pedunculus cerebellaris superior. Мащабна скала = 50 µm.



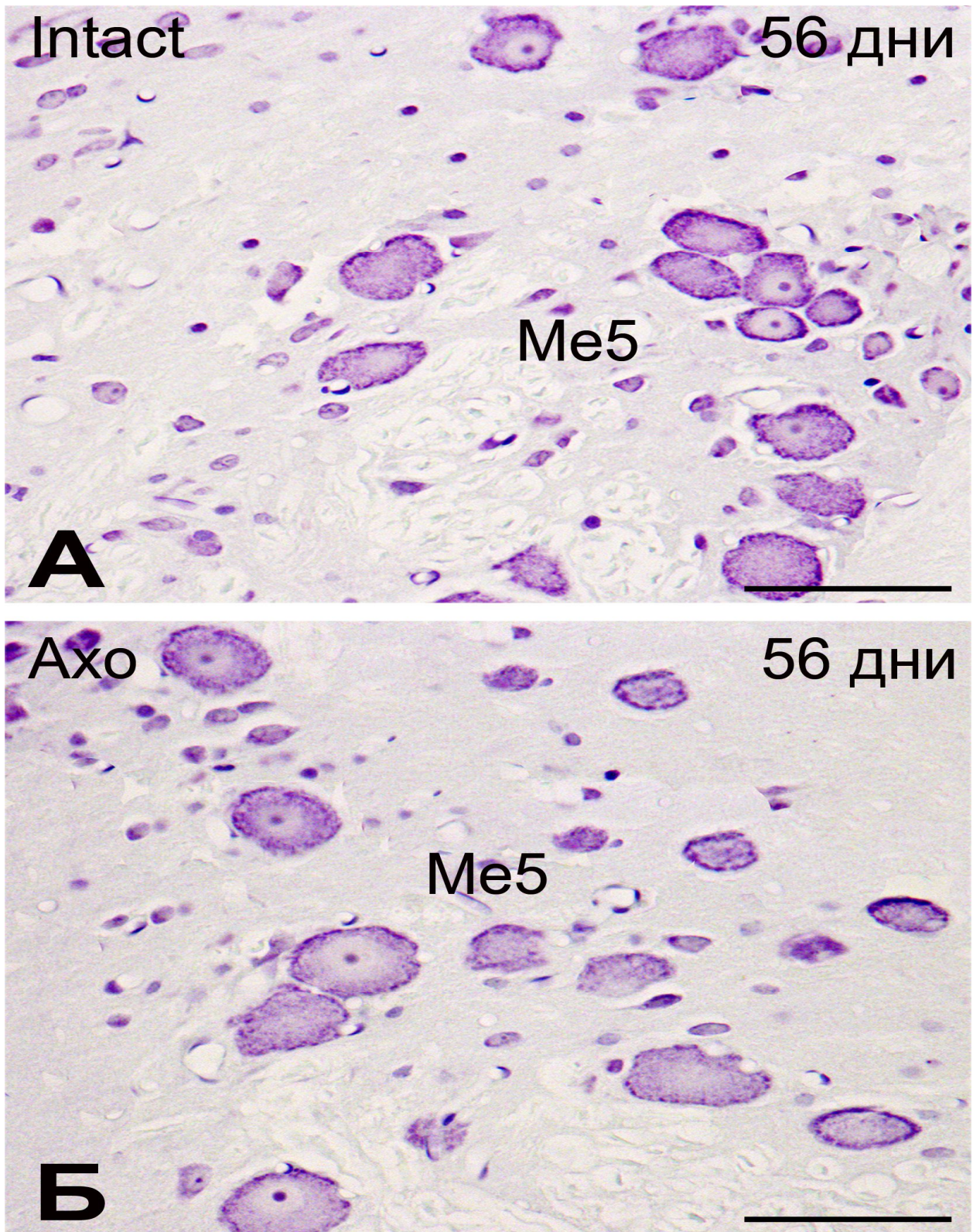
Фигура 5.16 Подобна находка се установява в каудалната средномозъчна част на Me5 у плъх 28 дни след едностранна аксотомия на *n. massetericus*. Ясно се забелязват дегенерирани профили на разпръснати аксотомирани Me5 неврони. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μ m.

След период на преживяване след оперативното вмешателство от 56 дни, броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията все още е по-малък, макар че вече е трудно да се забележат значими и отчетливи различия в сравнение с картината на интактната страна (фиг. 5.17). Освен това, не се установяват и визуално забележими промени в морфологията на Me5 неврони от ипсилатералната и контралатералната мозъчна страна (фиг. 5.18А, Б).

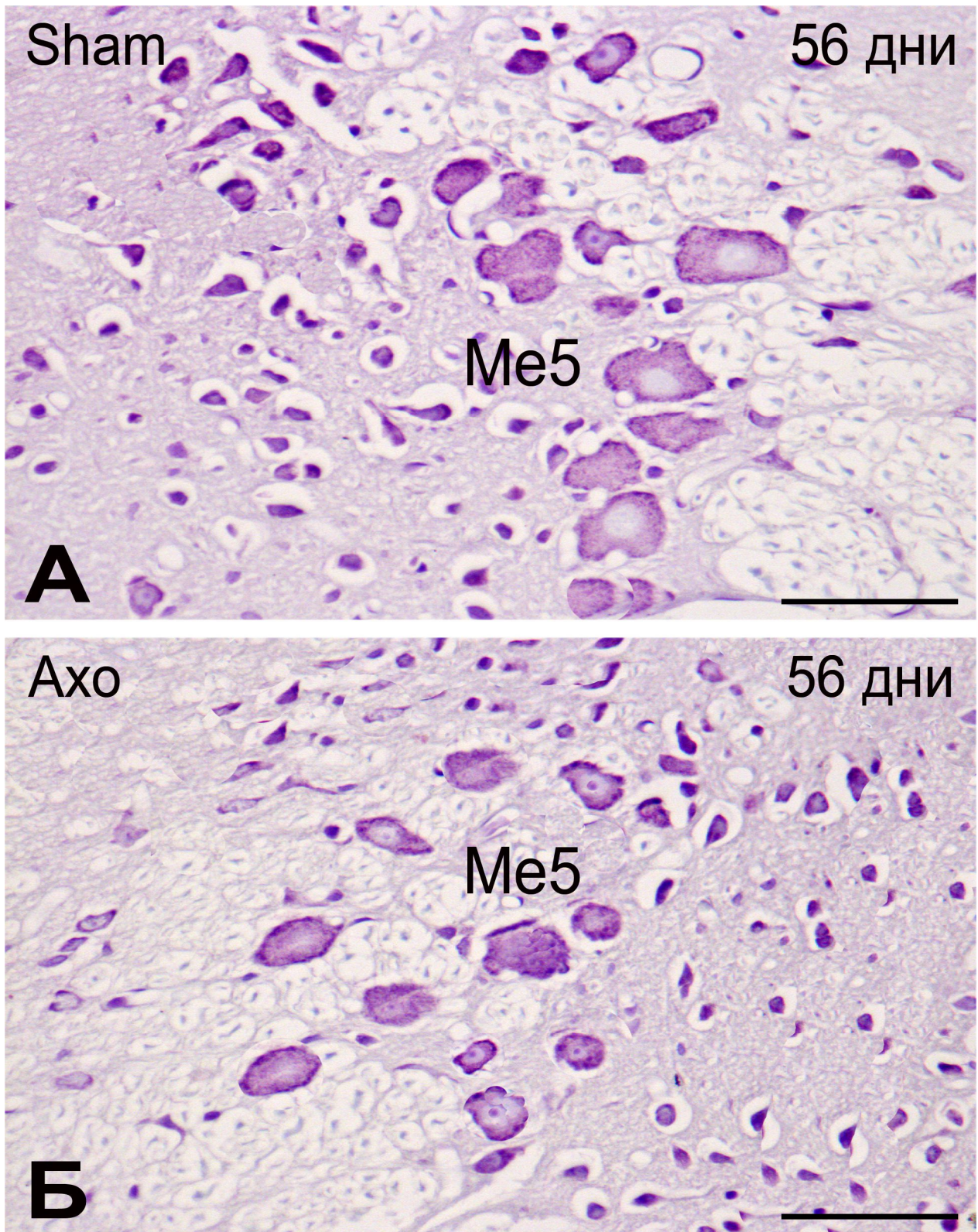


Фигура 5.17. Микрофотография през мостовата част на Me5 у плъх 56 дни след едностранно прерязване на п. massetericus. Броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) е все още видимо по-малък от този на невроните в интактната мозъчна половина (стрелка). LC, locus coeruleus; 4V, ventriculus quartus. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100 μ m.

Подобна констатация за документираните хронологично промени в броя и морфологията на мезенцефалните тригеминални неврони може да се направи и при сравнение на аксотомияните Me5 неврони със срещуположните неврони в ядрото от контролната страна, на която е проведена само лъжлива оперативна интервенция с разрязване и последващо зашиване на кожата без прекъсване на периферния нерв (фиг. 5.19А, Б).



Фигура 5.18. По-голямото увеличение на интактната (А) и очертаната в правоъгълник аксотомизирана страна (Б) на Me5 от предходната фигура 56 дни след едностранна аксотомия. Броят и морфологията на мезенцефалните тригеминални неврони от двете страни са приблизително еднакви. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μm .

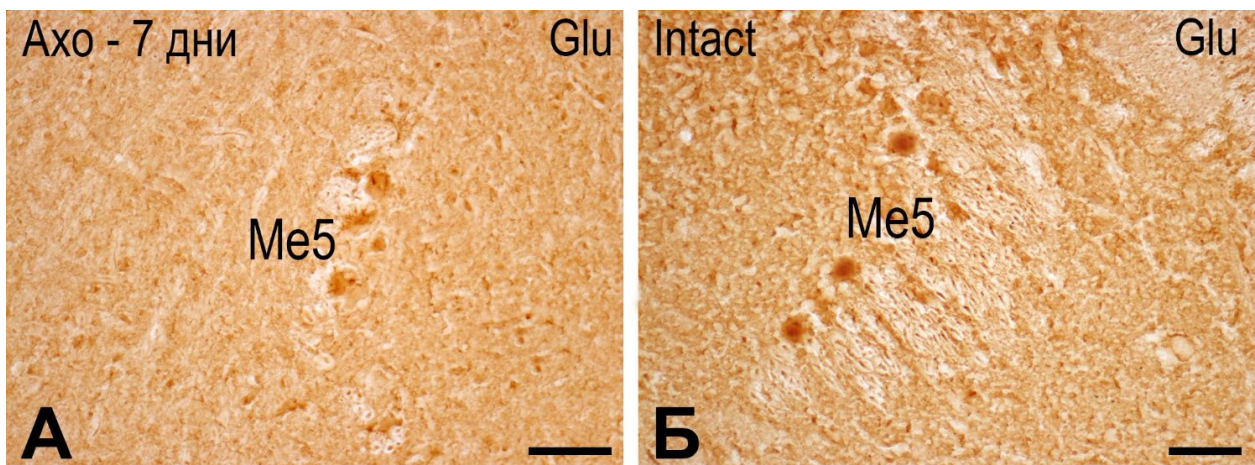


Фигура 5.19. Сходна е хистологичната находка на мезенцефалните тригеминални неврони (Me5) на страната на лъжливооперираната (А) и аксотомирана (Б) мозъчна половина 56 дни след оперативната интервенция. Броят и морфологията на мезенцефалните тригеминални неврони от двете страни са приблизително еднакви. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50 μ m.

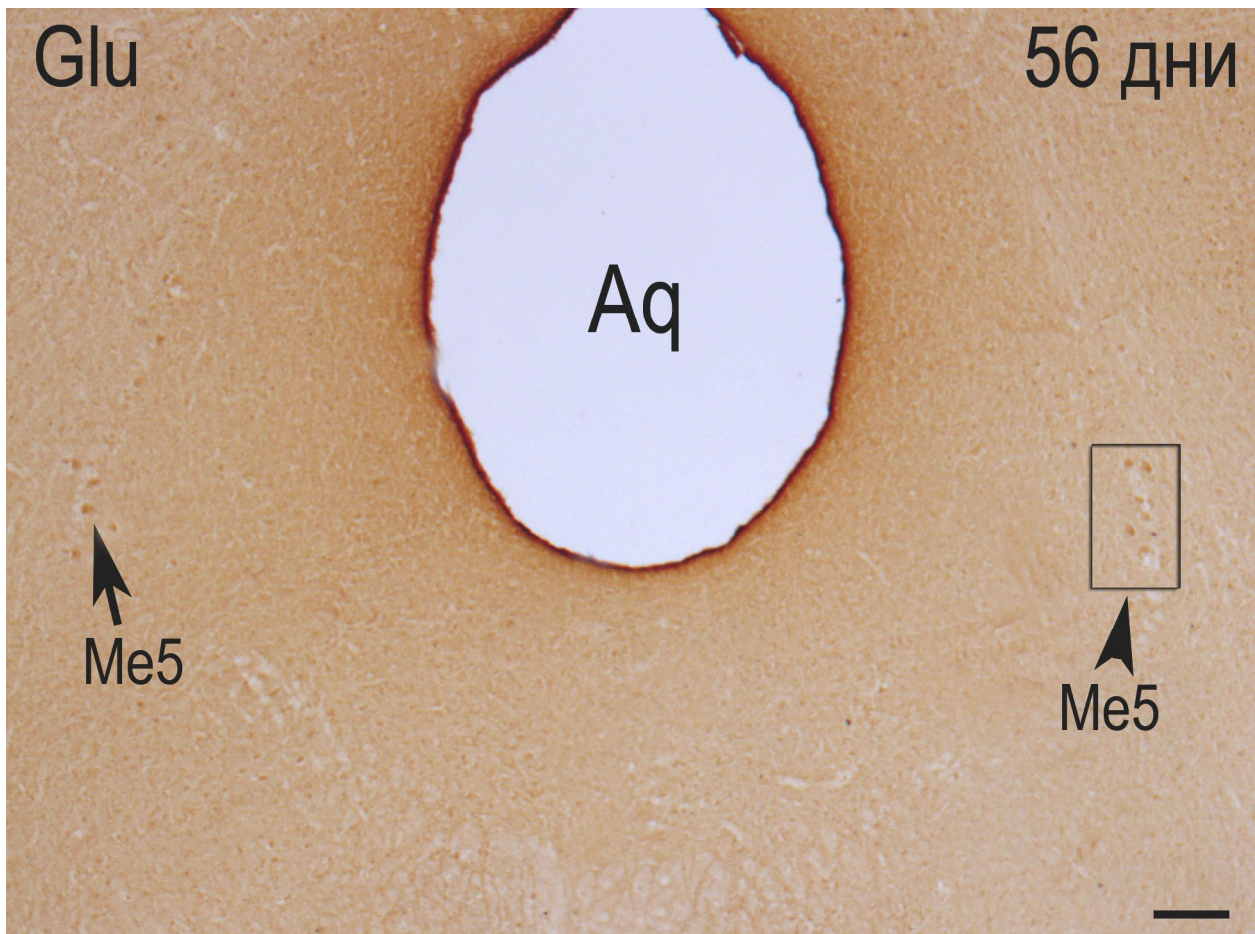
5.3. Неврохимични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия

5.3.1. Пластични промени в експресията на класически невротрансмитери

От изследванията ни върху невротрансмитерната принадлежност на мезенцефалните тригеминални неврони в нормални условия е известна тяхната глутаматергична природа. Ето защо в настоящето изследване ние проследихме промените в експресията на тази аминокиселина след експериментално едностранно прерязване на *n. massetericus* и последваща имунохистохимия за демонстриране на неговото наличие в изследваното ядро. Една седмица след аксотомията по цялото протежение на ядрото на страната на увредата установихме намалена имунореактивност към глутамат в засегнатите неврони (фиг. 5.20А), в сравнение с експресията ѝ в интактните Me5 неврони (фиг. 5.20Б). Отчетлива тенденция към понижен интензитет на имунооцветяване бе регистрирана и на 14-ти, 21-ви, 28-ми ден след оперативната интервенция, а 56 дни след нея броят и интензитетът на имунооцветяване на увредените неврони се доближи до този на незасегнатите такива (фиг. 5.21).

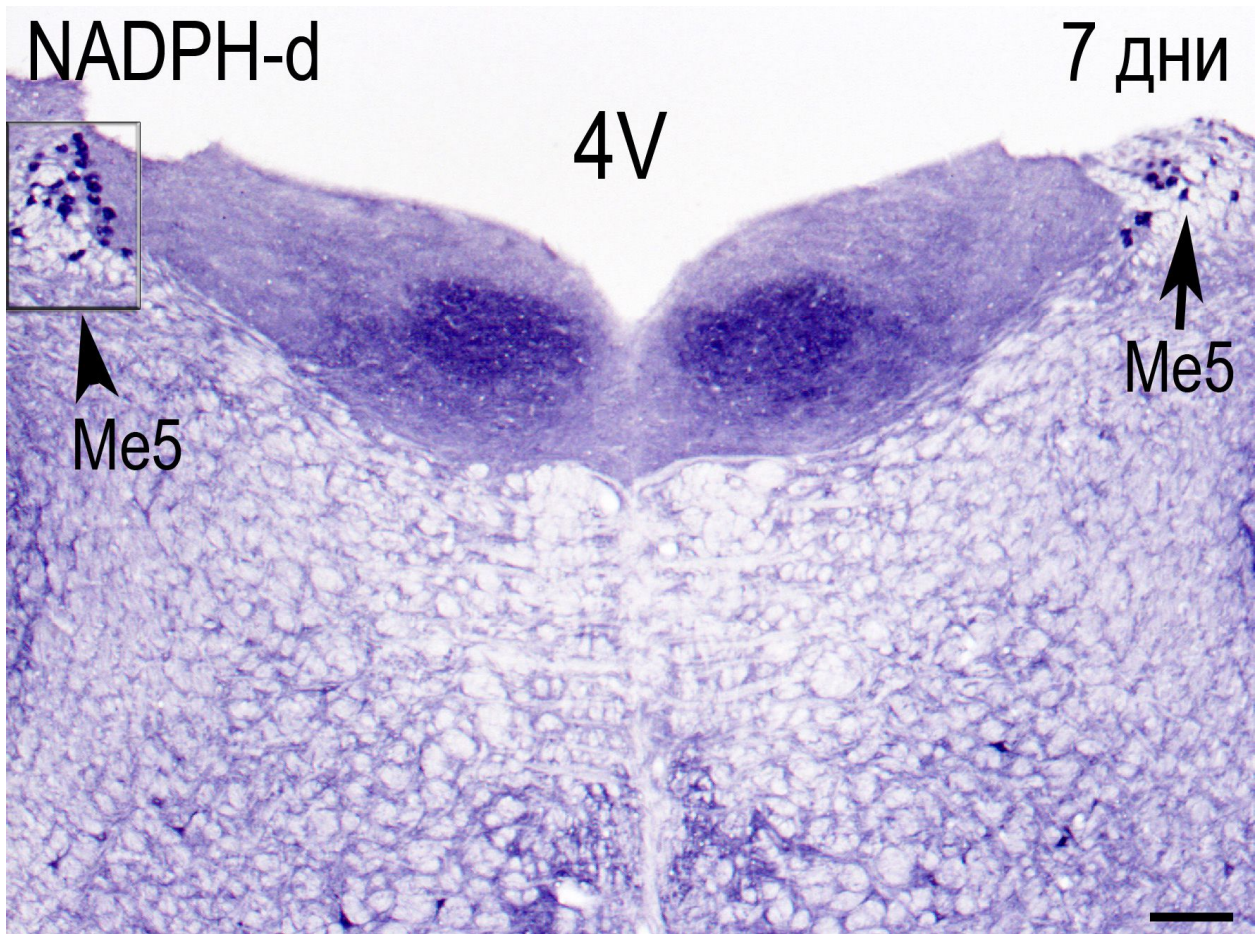


Фигура 5.20. Имунохистохимична реакция за глутамат (Glu) в каудалната част на Me5 у плъх 7 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus*. Броят на Glu-имунореактивните мезенцефални тригеминални неврони и интензитетът на тяхното оцветяване на аксотомизираната страна (А) е по-малък в сравнение на броя и интензитетът на имунооцветяване на Me5 неврони на интактната страна (Б). Мащабна скала = 50 μ m.



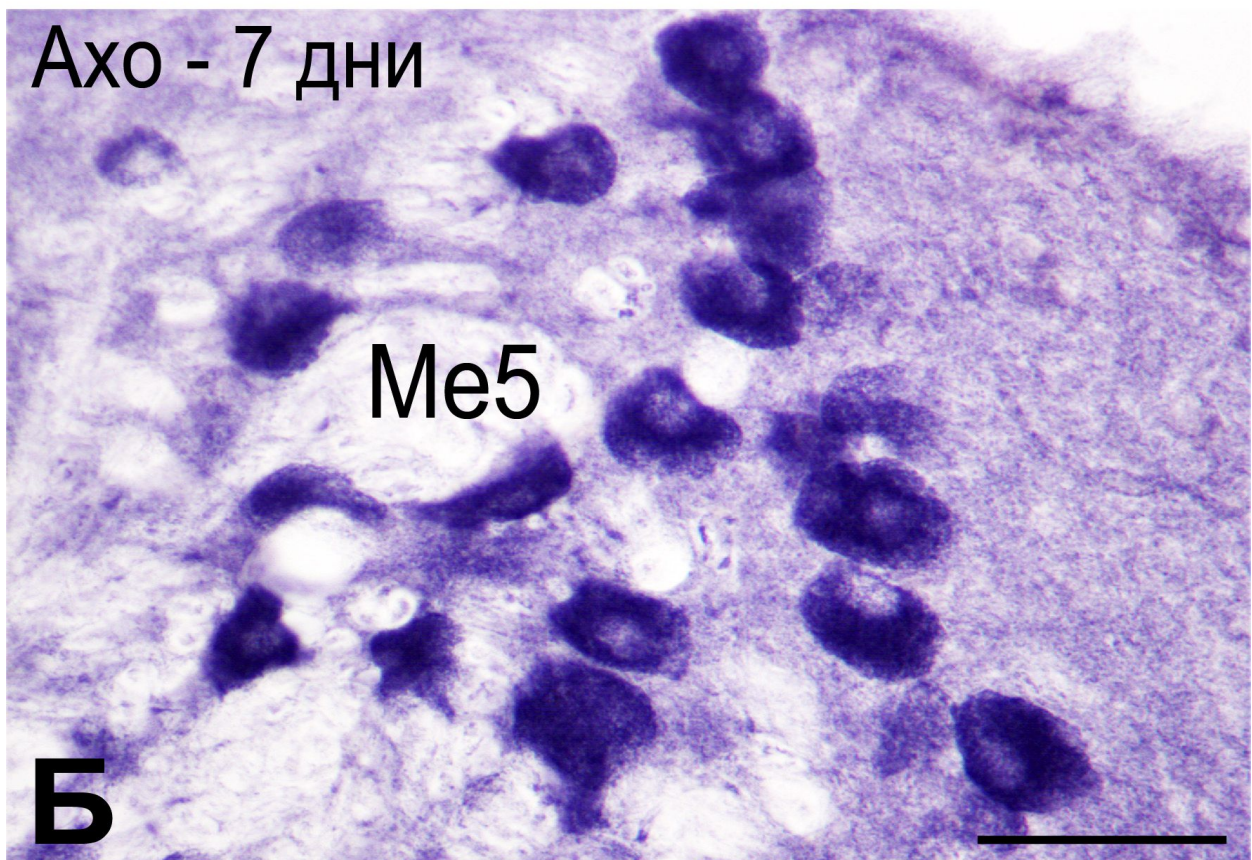
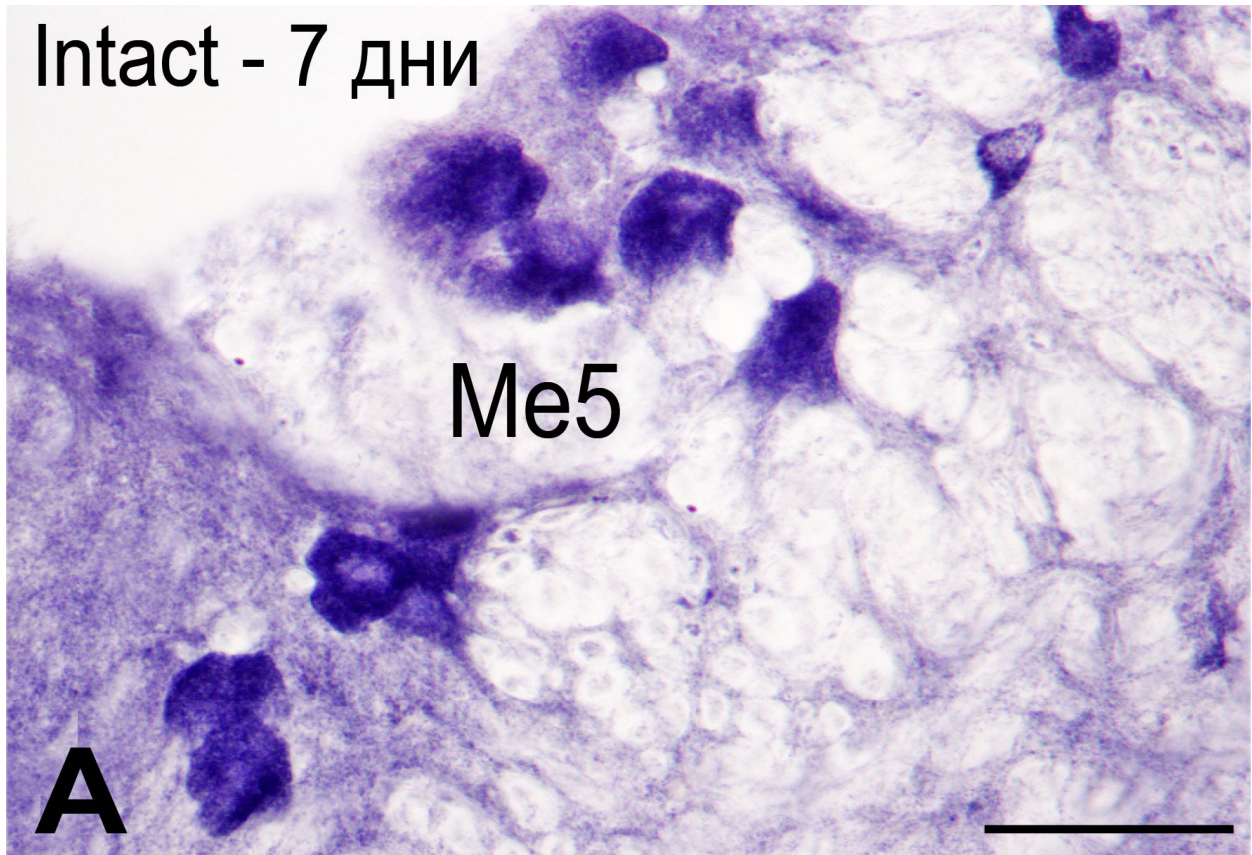
Фигура 5.21. Имунохистохимична реакция за глутамат (Glu) в ростралната част на Me5 у плъх 56 дни след едностранно прерязване на *p. massetericus*. Броят на Glu-имунореактивните мезенцефални тригеминални неврони и интензитетът на тяхното оцветяване на аксотомираната страна (глава на стрелка) са приблизително еднакви в сравнение с тези на невроните на интактната мозъчна половина (стрелка). Aq, aqueductus cerebri. Мащабна скала = 100 μ m.

Нашите опити да установим индуцирани от аксотомията промени в експресията на тирозинхидроксилаза (ТН), ключов ензим в синтезата на катехоламините, не се увенчаха с успех. В нито един от изследваните от нас периоди след едностранно периферно прекъсване на периферен нерв не установихме ТН имунореактивност в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони. Единствено нервни влакна и техните терминали в Me5 показваха позитивна реакция за ензима на страната на интактната мозъчна половина.

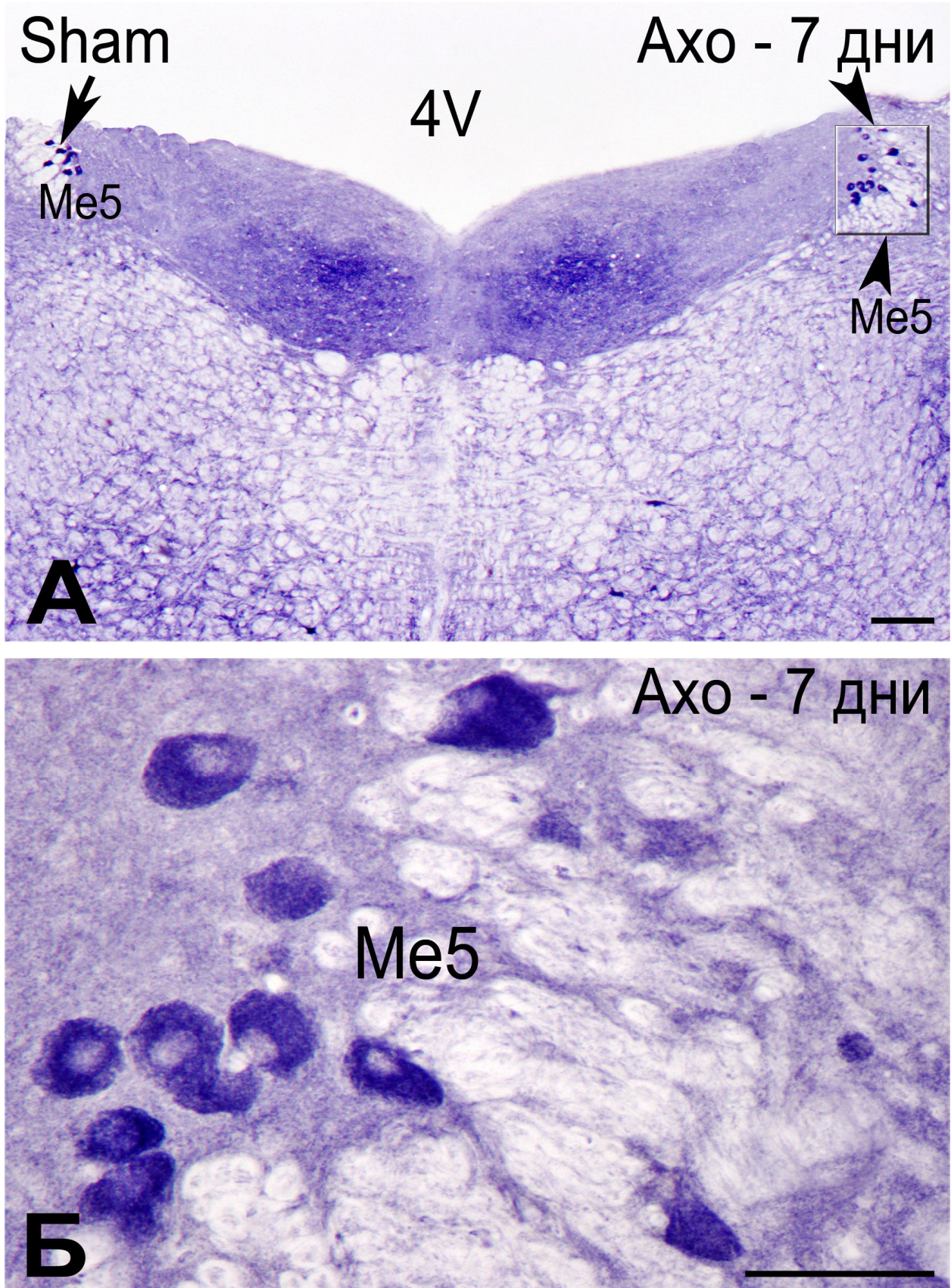


Фигура 5.22. Хистохимична реакция за NADPH-диафараза в каудалната част на Me5 у плъх. Седем дни след аксотомията броят на реактивните Me5 неврони на страната на увредата (глава на стрелка) е по-голям в сравнение с този в ядрото на интактната мозъчна половина (стрелка). Мащабна скала = 100 μ m.

Прилагайки хистохимична реакция за визуализация на NADPH-диафараза, ние установихме че седем дни след интервенцията, броят на нитрергичните Me5 неврони е увеличен на страната на увредата в сравнение с интактната страна (фиг. 5.22, 5.23). Подобна е находката при сравнение броя на реактивните Me5 неврони на аксотомираната и лъжливо оперираната страна (фиг. 5.24). Тенденцията за повишаване на броя на аксотомираните нитрергични мезенцефални тригеминални неврони бе наблюдавана до края на първия постоперативен месец. Два месеца след интервенцията, обаче, не бе установена видима промяна в броя на NADPH-диафараза реактивните Me5 неврони между оперираната и интактната мозъчна половина.



Фигура 5.23. Голямо увеличение на фиг. 5.22, демонстриращо разликата в броя на интактните (А) и аксотомирани (Б) NADPH-диафораза реактивни Me5 неврони. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 5.24. (А) 7 дни след интервенцията, броят на аксотомираните NADPH-диафораза реактивни Me5 неврони (глава на стрелка) е по-голям в сравнение с този на невроните на лъжливооперирания страна (стрелка). (Б) По-голямо увеличение на ядрото от страната на увредата. Мащабна скала = 100 μ m (А); 50 μ m (Б).

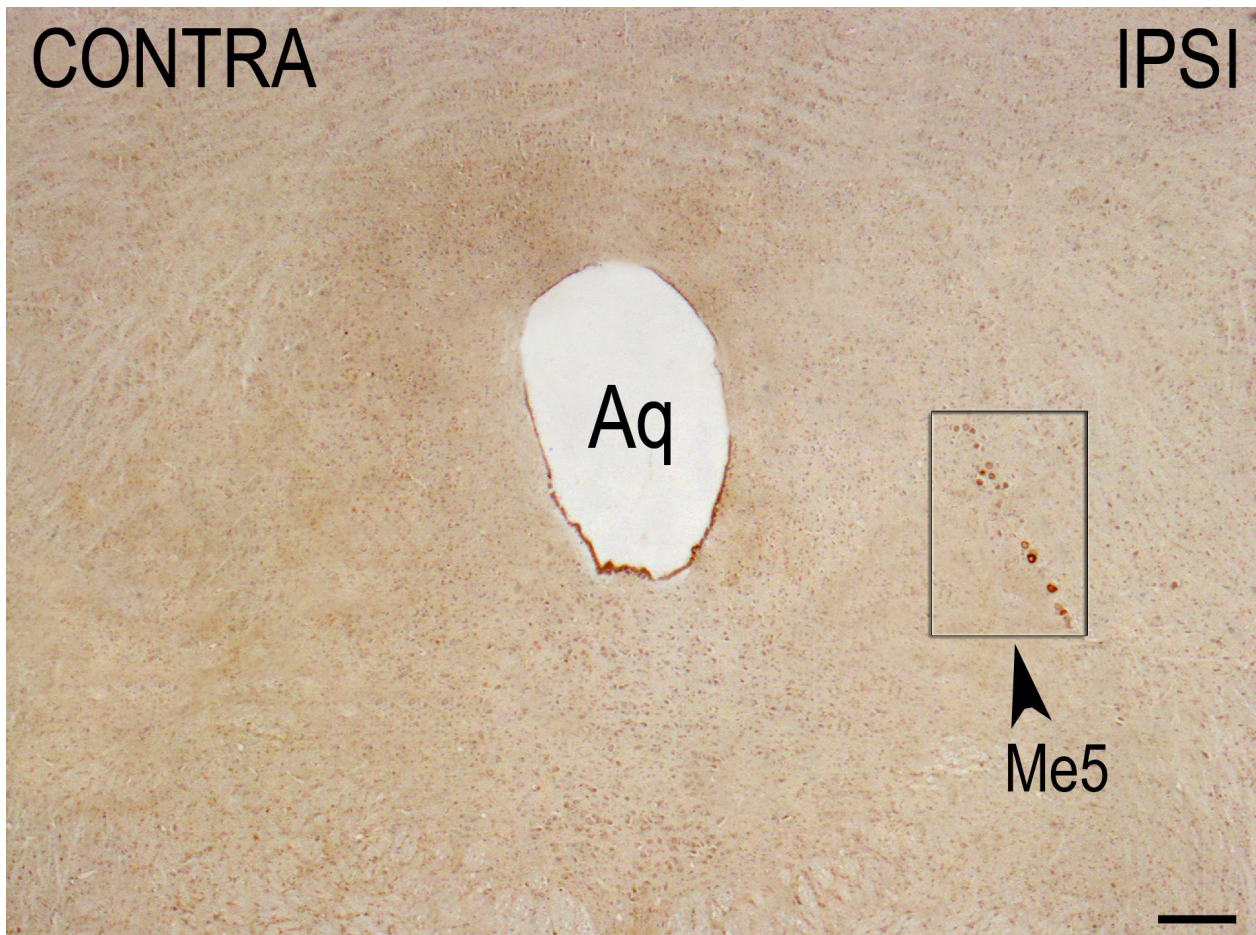
5.3.2. Пластични промени в експресията на невроактивни пептиди

Предишни наши експерименти са демонстрирали, че в нормални условия интактните мезенцефални тригеминални неврони не експресират невропептидна имунореактивност в техните клетъчни тела. Периферната аксотомия обаче променя техния фенотип в посока *de novo* експресия на някои невропептиди. В нашето изследване ние тествахме наличието, както на някои „сетивни“ невропептиди като SP и CGRP, така и на пептиди като VIP, NPY и GAL, които обичайно се съдържат в перикарионите на симпатиковите неврони.

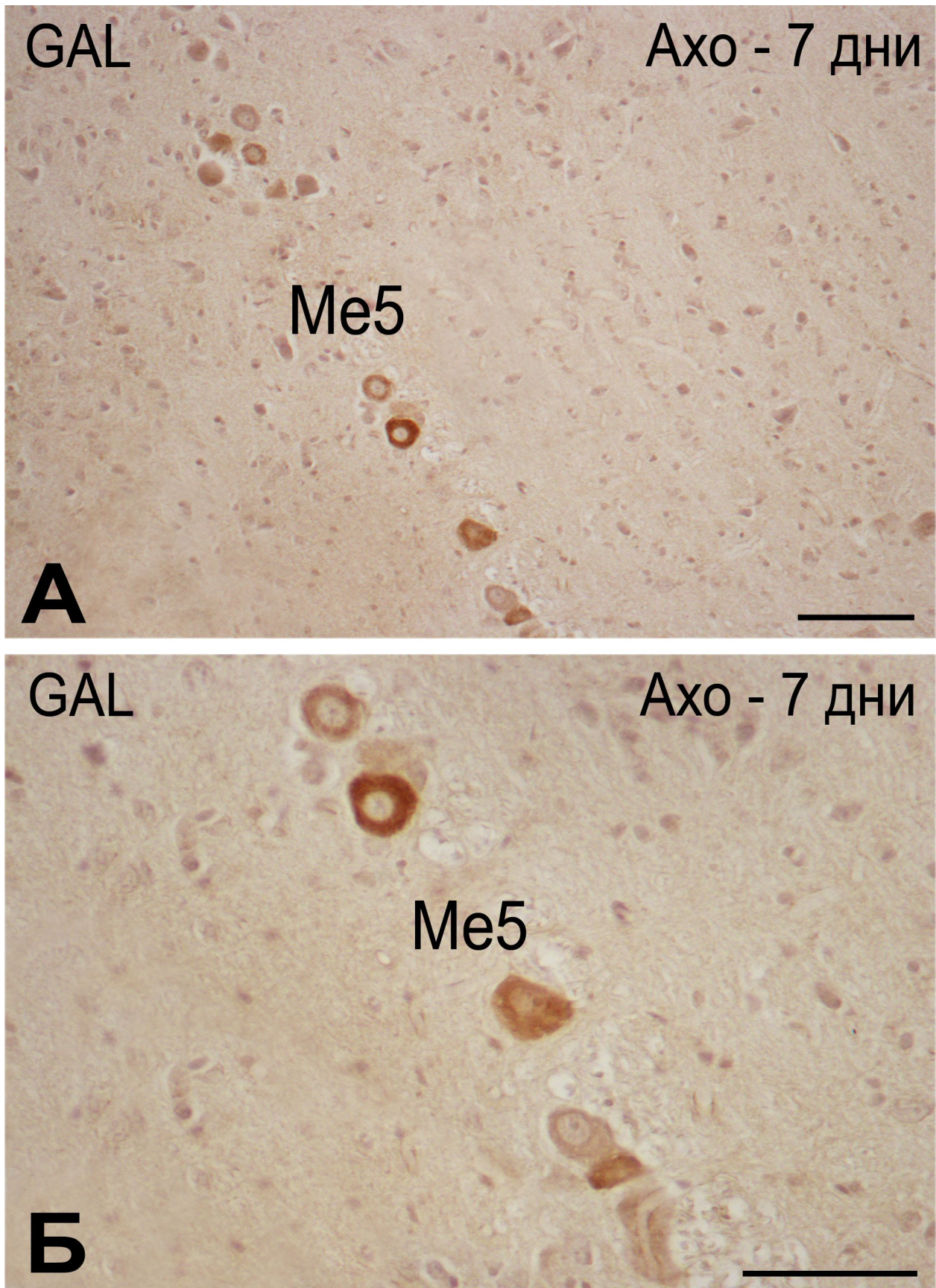
След прилагане на антитела срещу SP и CGRP, ние не успяхме да установим наличие на тези два пептида в клетъчните тела и/или израстъците на аксотомираните мезенцефални неврони по цялото ростокаудално разположение на Me5 в нито един от изследваните периоди на преживяване след едностранната периферна аксотомия.

Реакцията за GAL в животните, субект на едностранна аксотомия, бе подчертано позитивна в ипсилатералната страна, докато контралатерално тя бе негативна. Положително имунооцветяване беше наблюдавано и в невроните на съседните ядра – *locus coeruleus* и медиално парабрахиално ядро. Положителна GAL-имуноореактивност ясно бе забелязана в големите по размери аксотомирани Me5 неврони по цялото ростокаудално протежение на ядрото, и в единични малки неврони в мостовата част на ядрото. Тя бе позитивирана още на 7-ия ден след прерязването на нерва, персистираще две до четири седмици след това и постепенно затихваше към 56-ти ден след интервенцията (фиг. 5.25, 5.26).

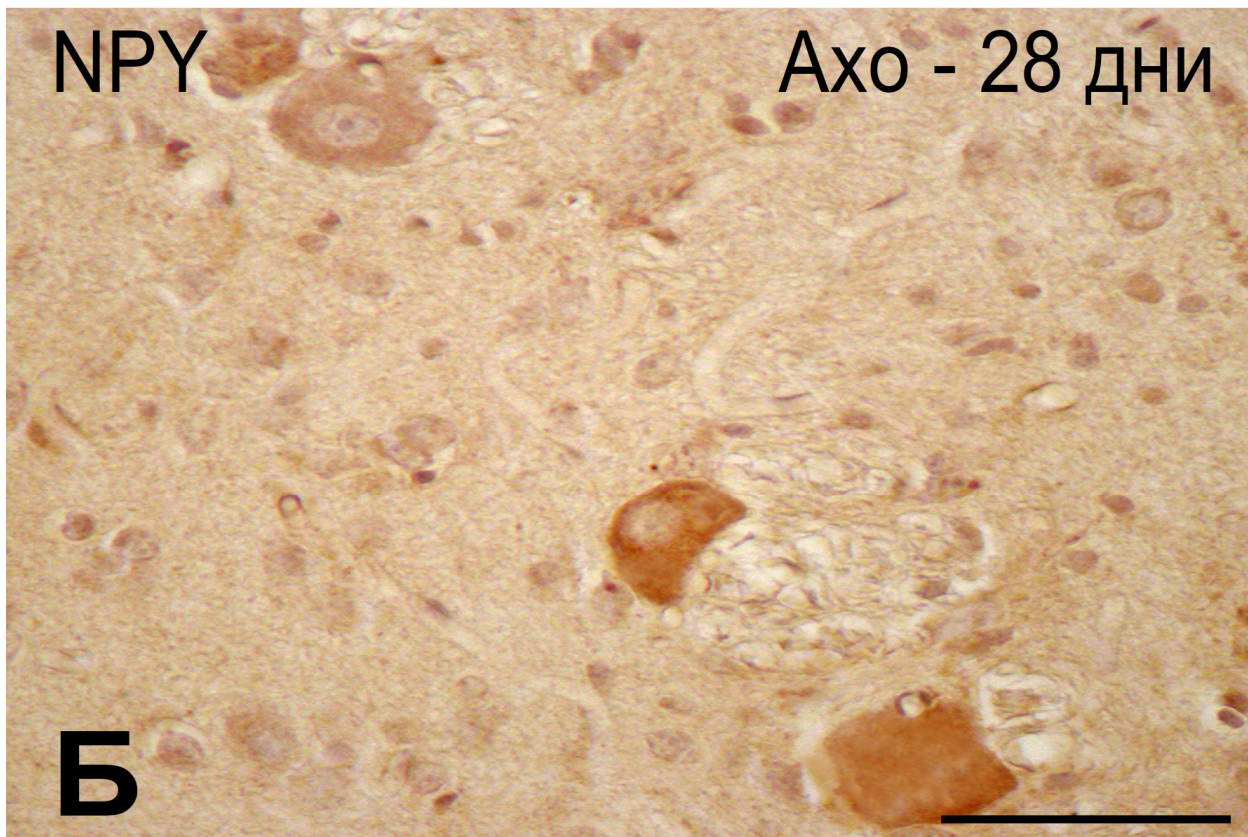
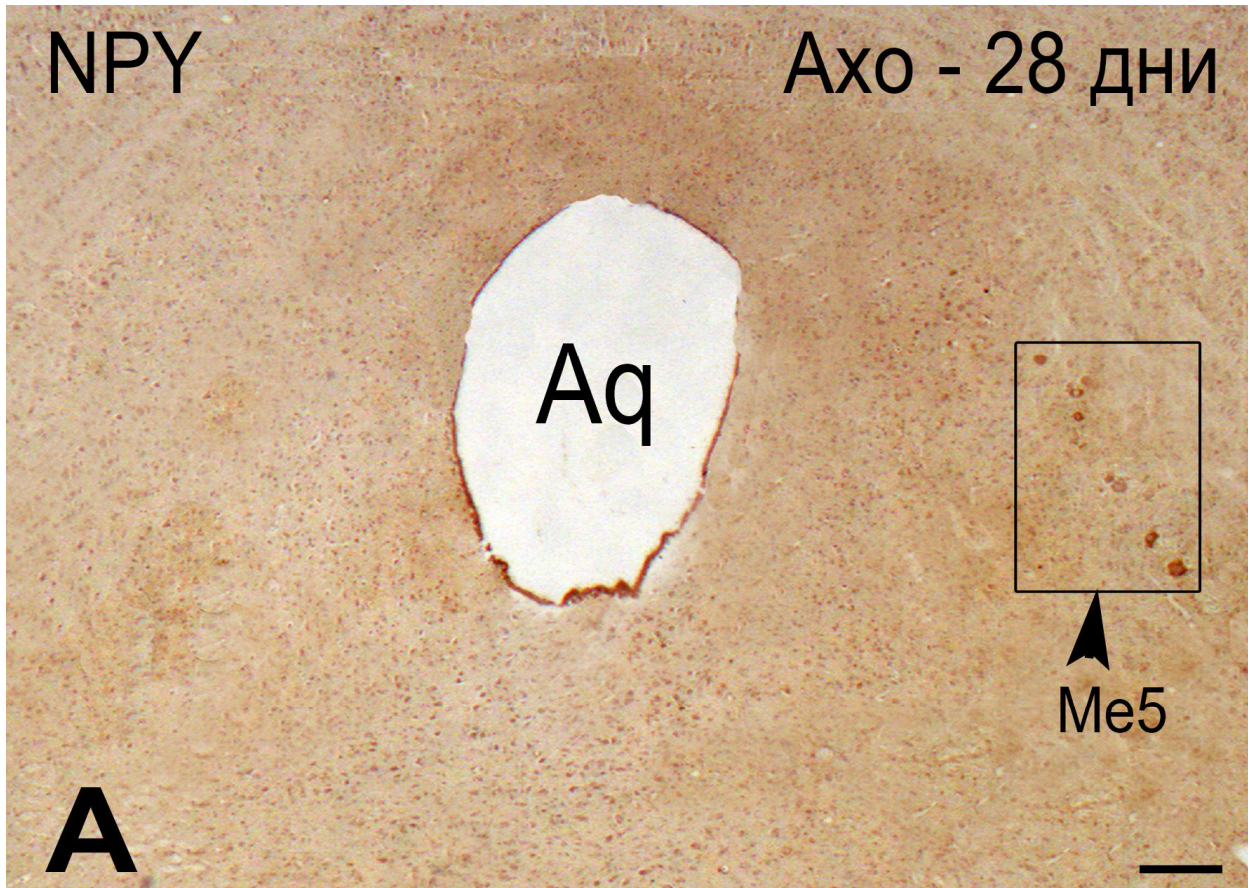
Подобна бе реакцията и за другите изследвани от нас невропептиди – VIP и NPY, но интензитетът на наблюдаваната имунореактивност в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони бе сравнително по-слаба. По-конкретно ние установихме, че 14 дни след аксотомията реакцията за NPY бе с почти същата интензивност, но с лека тенденция към намаляване, което е видимо забележимо на 28-ия ден след оперативната процедура (фиг. 5.27).



Фигура 5.25. Имунохистохимична реакция за GAL в Me5 у плъх на ниво среден мозък 7 дни след експериментално едностранно прерязване на *p. massetericus*. Отбележете появата на GAL-имунореактивни мезенцефални тригеминални неврони (глава на стрелка) на ипсилатералната на аксотомията страна и тяхната липса на интактната контралатерална мозъчна половина. Aq, *aqueductus cerebri*. Мащабна скала = 100 μm .



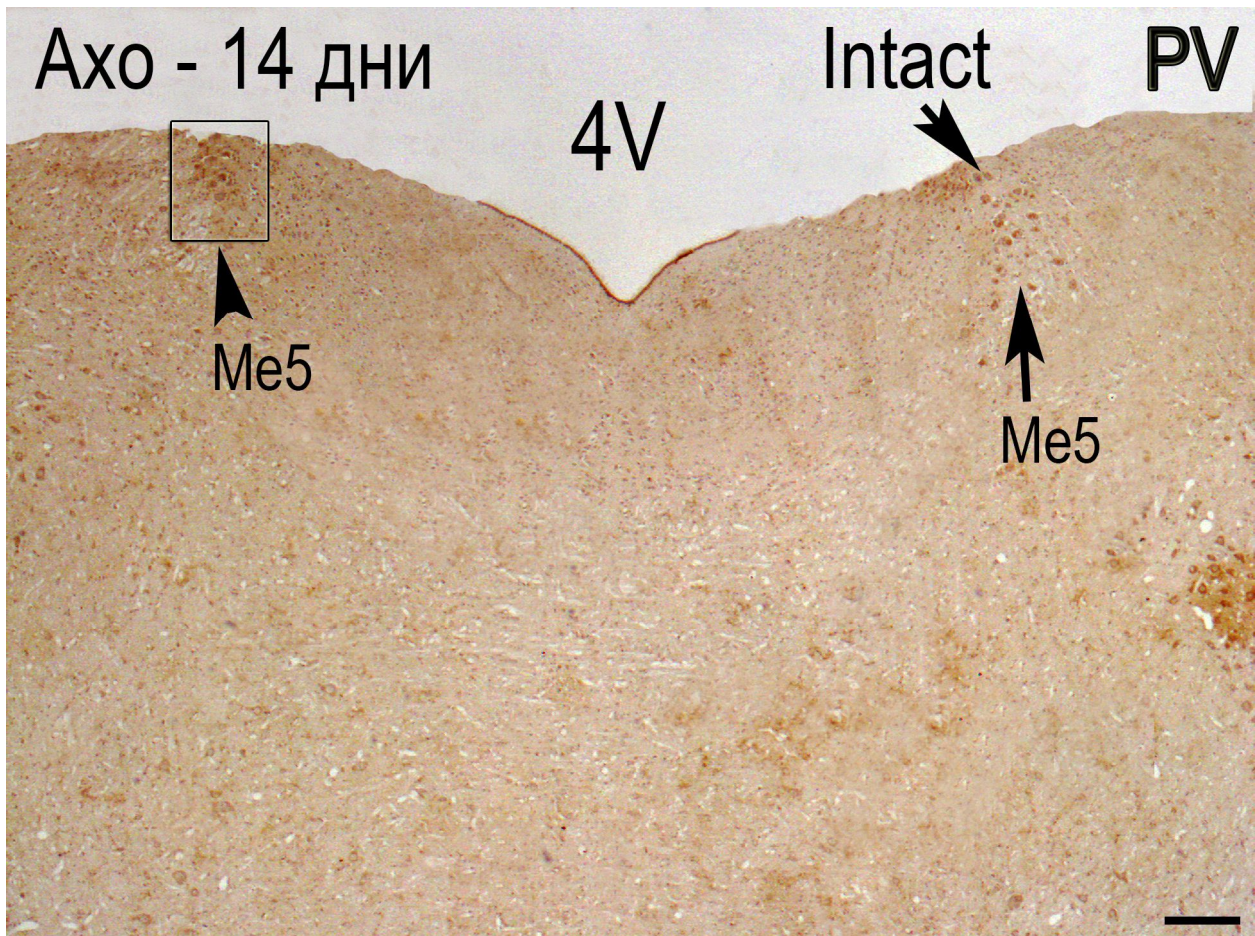
Фигура 5.26. (А, Б) По-големи увеличения на правоъгълника, очертан в предишната микрофотография, показващ GAL-имунореактивни аксотомирани Me5 неврони 7 дни след оперативната интервенция. Мащабна скала = 50 μ m.



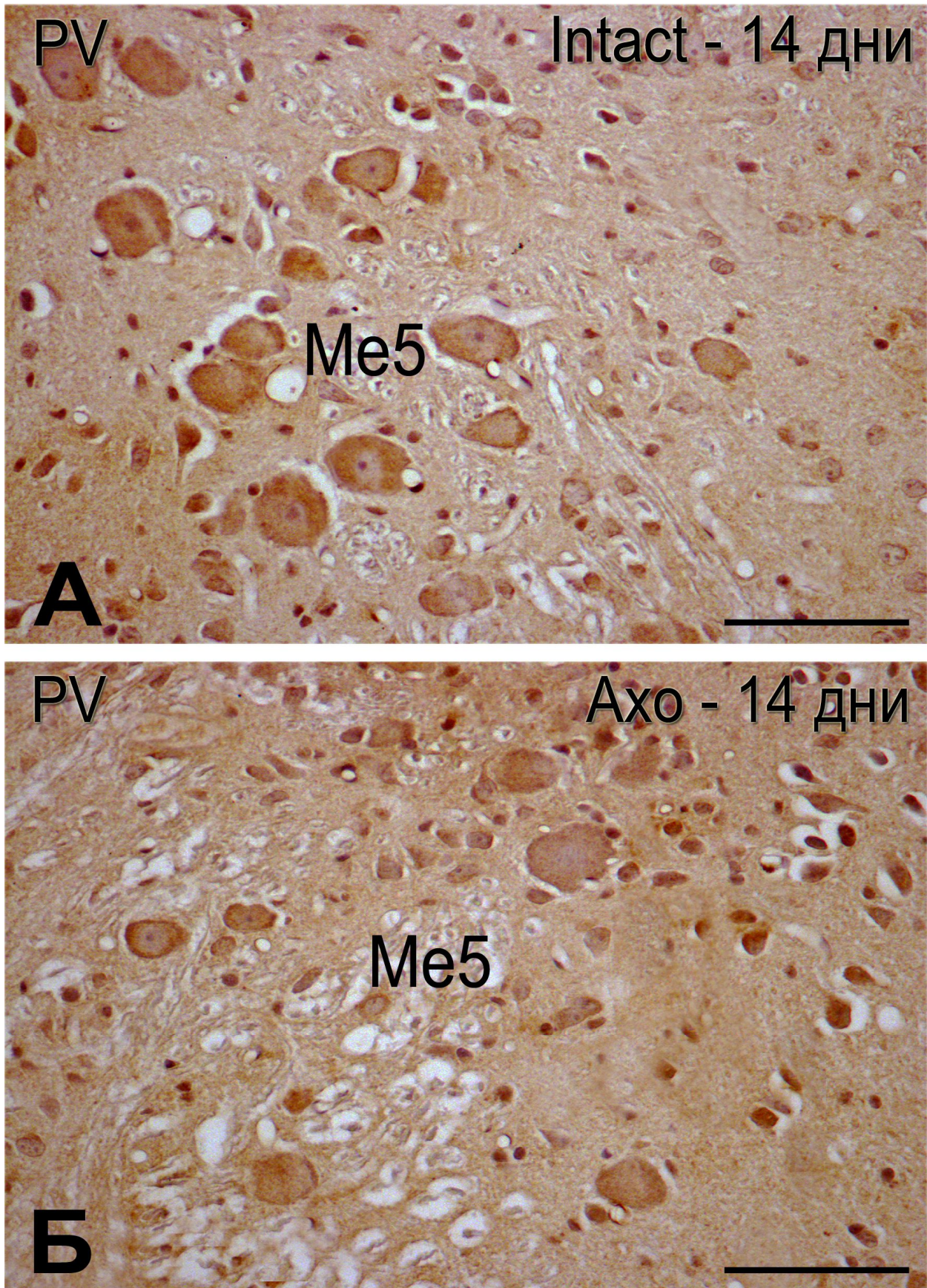
Фигура 5.27. (А, Б) NPY-имунореактивни аксотомирани Me5 неврони (глава на стрелка) в средномозъчната част на ядрото 28 дни след периферна аксотомия. Aq, aqueductus cerebri. Мащабна скала = 50 μ m.

5.3.3. Пластични промени в експресията на калций-свързващи протеини

В ранните етапи (до една седмица) след унилатерално прерязване на *n. massetericus*, не установихме видими промени в имунохистохимичното съдържание на някои неврон-специфични калций-свързващи протеини като парвалбумин и калбиндин D-28 в мезенцефалните тригеминални неврони от засегнатата мозъчна страна. Имунобелязаните неврони от двете страни бяха със средни и големи по размери клетъчни тела и ясна псевдоуниполярна морфология. Мезенцефалните тригеминални неврони в интактното ядро също показваха имунореактивност към парвалбумин и калбиндин с приблизително еднакъв интензитет на оцветяване и малки различия в модела на имунооцветяване. За отбелязване е, обаче, че калбиндин-имунореактивните неврони в Me5 бяха по-малобройни в сравнение с парвалбумин-имунопозитивните такива в ядрото. След преживяване от 7 постоперативни дни не успяхме да регистрираме забележима промяна в експресионния профил на двата изследвани от нас калций-свързващи протеини в интактните и аксотомияните мезенцефални тригеминални неврони. Две седмици след аксотомията наблюдавахме намаление в експресионните им нива в аксотомияните Me5 неврони по цялото протежение на ядрото, като това намаление бе значително по-силно изразено за парвалбумин (фиг. 5.28, фиг. 5.29), и бе по-незначително, но ясно забележимо, за калбиндин. Броят на парвалбумин-съдържащите Me5 неврони ипсилатерално на нервното прерязване бе по-малък отколкото този, наблюдаван в контролните животни, докато броят на калбиндин-съдържащите невронални профили беше почти същият. Установените различия се отнасят до интензивността, а не до броя на имунопозитивните неврони и бяха отчетливи при сравнение, както с контралатералните интактни Me5 неврони, така и с тези от същата страна на контролните животни, при които бе проведена само лъжлива оперативна интервенция, включваща хирургично срязване на кожата и меките тъкани без последващо прерязване на периферния нерв. 56 дни след интервенцията не беше установено ипсилатерално намаляване в експресията на калций-свързващите протеини и тяхното ниво бе почти същото, сравнено с това в началните дни на преживяване след периферната аксотомия.



Фигура 5.28. Имунохистохимично демонстриране на PV в мостовата част на Me5 14 дни след едностранна периферна аксотомия. Отбележете видимо намаления брой на PV-имунореактивните мезенцефални тригеминални неврони на аксотомираната страна (глава на стрелка) в сравнение с този на интактната мозъчна половина (стрелка). 4V, ventriculus quartus. Мащабна скала = 50 μm .



Фигура 5.29. По-големи увеличения на интактните (А) и аксотомирани (Б) PV-имунореактивни Me5 неврони от предишната фигура. Мащабна скала = 50 μ m.

5.4. Статистически анализ на резултатите

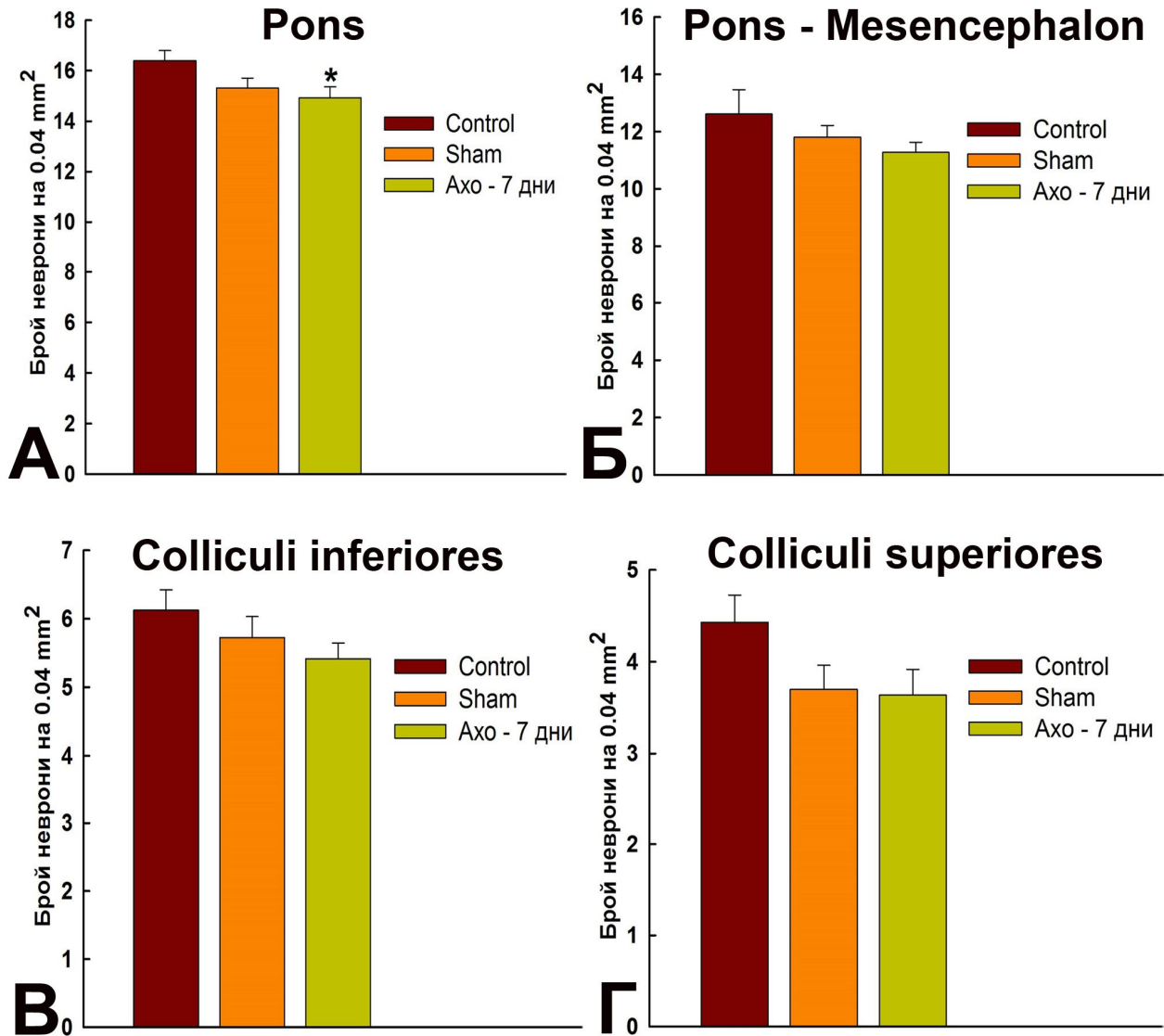
Експерименталните животни в нашето изследване бяха разделени в 7 групи като всяка от тях включваше равен брой анализирани животни (n=5).

Експерименталните групи бяха както следва:

- ✓ контролна група плъхове (Control);
- ✓ фалшиво оперирана група (Sham), която изпълнява роля на допълнителна контрола;
- ✓ експериментална група животни, преживели 7 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus* (Ахо - 7 дни);
- ✓ експериментална група животни, преживели 14 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus* (Ахо - 14 дни);
- ✓ експериментална група плъхове преживели 21 дни след едностранна аксотомия на *n. massetericus* (Ахо - 21 дни);
- ✓ експериментална група плъхове, преживели 28 дни след едностранна аксотомия на *n. massetericus* (Ахо - 28 дни);
- ✓ експериментална група животни, преживели 56 дни след едностранна аксотомия на *n. massetericus* (Ахо - 56 дни);

За всяка група плъхове сме анализирали броя на мезенцефалните тригеминални неврони на единица площ от 0.04 mm², при дебелина на парафиновите срезове от 7 µm, на 4 rostrocaudalни мозъчни нива, а именно: на ниво мост (*pons*), преходна зона (*pons-mesencephalon*), *colliculi inferiores* и *colliculi superiores*. Получените резултати бяха анализирани с помощта на статистическа програма SigmaStat® 11.0 софтуерен пакет (Systat Software Inc). Експерименталните данни бяха сравнени с помощта на Student's *t*-test, като за статистически значими различия бяха приемани тези, при които стойността на *p* е <0.05.

При 7-дневните аксотомирани животни беше наблюдавано незначително понижение в броя на мезенцефалните тригеминални неврони и на четирите коронарни мозъчни нива в сравнение с контролната и фалшиво-оперираната група. Необходимо е да направим и уточнението, че само на ниво *pons* бе наблюдавано статистически значимо (*p*=0.017) понижение в броя на невроните в Me5 от 16.393±0.403 при контролната група на 14.920±0.443 при Ахо – 7 дни (фиг. 5.30).



Фигура 5.30. Схематично представяне на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) група, както и аксотомираниите и преживели 7 дни плъхове (Ахо – 7 дни) на ниво pons (А), pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (В) и colliculi superiores (Г). Данните представят средната стойност и стандартната грешка и са сравнени с помощта на Student's t-test (броя на изследваните животни във всяка група е n=5). * $p < 0.05$ спрямо контролната група.

Средният брой неврони в Me5 при контролната група на ниво pons-mesencephalon е 12.615 ± 0.851 спрямо 11.273 ± 0.359 при Ахо – 7 дни, на ниво colliculi inferiores е 6.125 ± 0.295 в сравнение в 5.417 ± 0.229 при аксотомираниите плъхове на 7 дни, а на ниво colliculi superiores е 4.429 ± 0.297 спрямо 3.636 ± 0.279

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

при Ахо – 7 дни (фиг. 5.30). Спрямо контролната и фалшиво-оперираната група и на четирите изследвани мозъчни нива не бяха забелязани статистически значими различия $p > 0.05$, въпреки че при Sham-групата беше наблюдавано слабо понижение в средния брой Me5 неврони.

Не бяха наблюдавани статистически значими различия в средния брой мезенцефални тригеминални неврони при сравнение на групите Ахо -7 дни и Sham. При Sham-групата, която в нашето изследване служи като допълнителна контрола, на ниво *pons* средният брой неврони бе 15.308 ± 0.399 , на ниво *pons-mesencephalon* бе 11.800 ± 0.416 , на ниво *colliculi inferiores* бе 5.727 ± 0.304 , а на ниво *colliculi superiores* той беше 3.700 ± 0.260 (фиг. 5.30).

Интересни резултати получихме при анализ на резултатите от преживелите 14 дни след интервенцията плъхове след едностранна аксотомия. От каудално към роstralно броят на невроните в Me5 от страната на аксотомията се променяше от 13.200 ± 0.416 в *pons*, на 9.063 ± 0.335 в *pons-mesencephalon*, на 4.444 ± 0.377 на ниво *colliculi inferiores* и 3.125 ± 0.227 в *colliculi superiores*. При това, във всички изследвани зони невроналната загуба от страната на аксотомията е статистически значима $p < 0.05$ в сравнение с контролните и Sham-групите на съответните нива (фиг. 5.31).

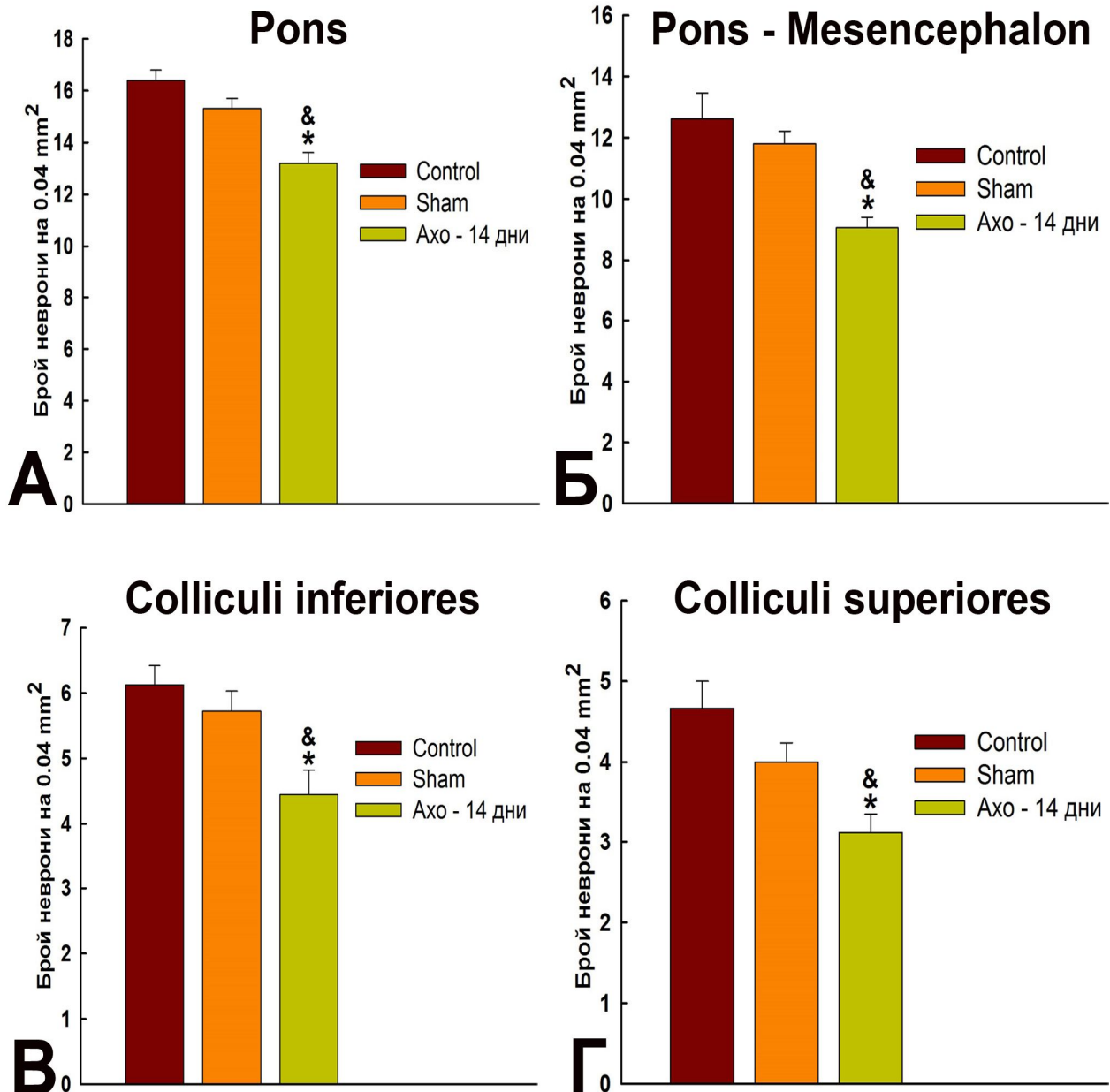
При Ахо – 21 дни ефектът от едностранното прерязване на *n. massetericus* се забелязваше най-силно, тъй като при тази група и в четирите изследвани области от каудална в роstralна посока невроналната загуба беше най-значима, а именно: 11.923 ± 0.265 в *pons*, 8.222 ± 0.173 в *pons-mesencephalon*, 3.824 ± 0.231 на ниво *colliculi inferiores* и 2.875 ± 0.125 на ниво *colliculi superiores* (фиг. 5.32). Невроналната загуба от страната на аксотомията бе статистически значима $p < 0.05$ както спрямо контролните групи, така и спрямо Sham-групите на съответните нива (фиг. 5.32).

При животните преживели 28 дни след едностранната периферна аксотомия в изследваните области продължаваща невронална загуба вече не беше наблюдавана, а регистрирахме леко покачване в средния брой неврони в съответните области, като стойностите, започвайки от каудално към роstralно бяха както следва: 13.333 ± 0.362 в *pons*, 9.550 ± 0.235 в *pons-mesencephalon*, 4.700 ± 0.260 на ниво *colliculi inferiores* и 3.125 ± 0.125 на ниво *colliculi superiores* (фиг. 5.33).

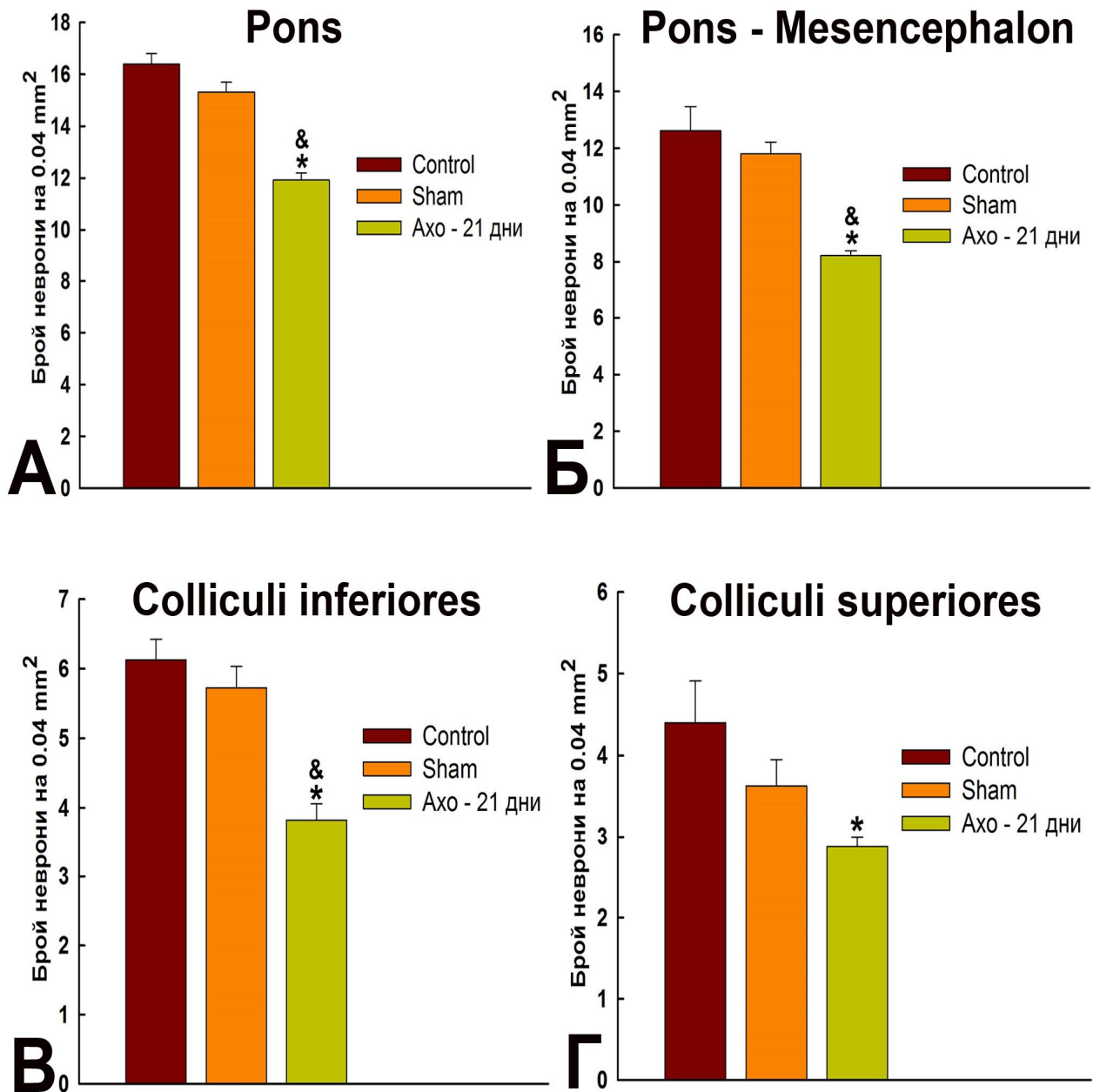
СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Морфологична и невхимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

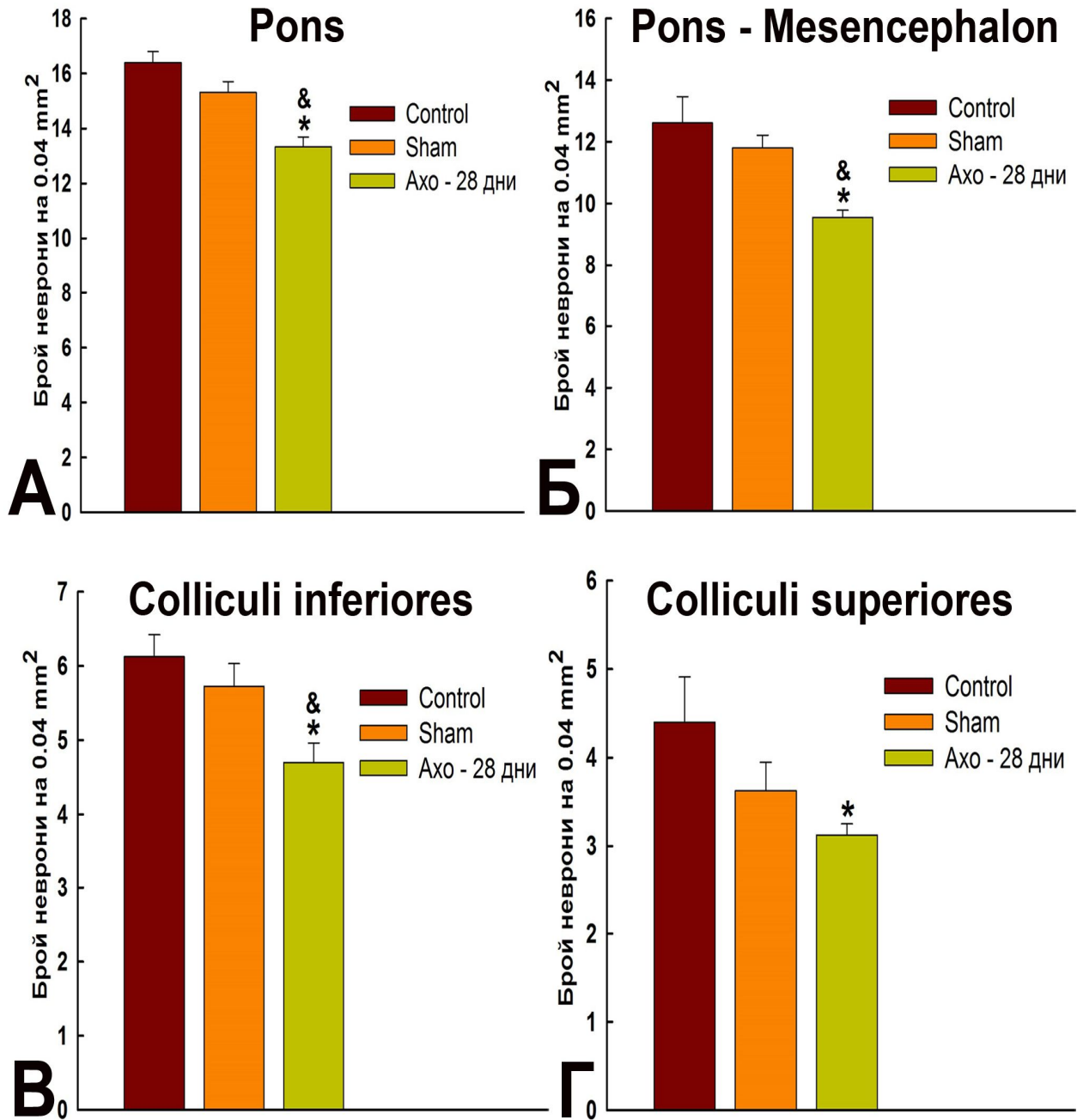
При Ахо – 56 дни броят на мезенцефалните тригеминални неврони от страната на аксотомията се доближаваше по стойност до резултатите, които наблюдавахме при Ахо – 7 дни. Статистически значими различия установявахме единствено между контролната и аксотомияната група животни на нива *pons* и *colliculi inferiores*.



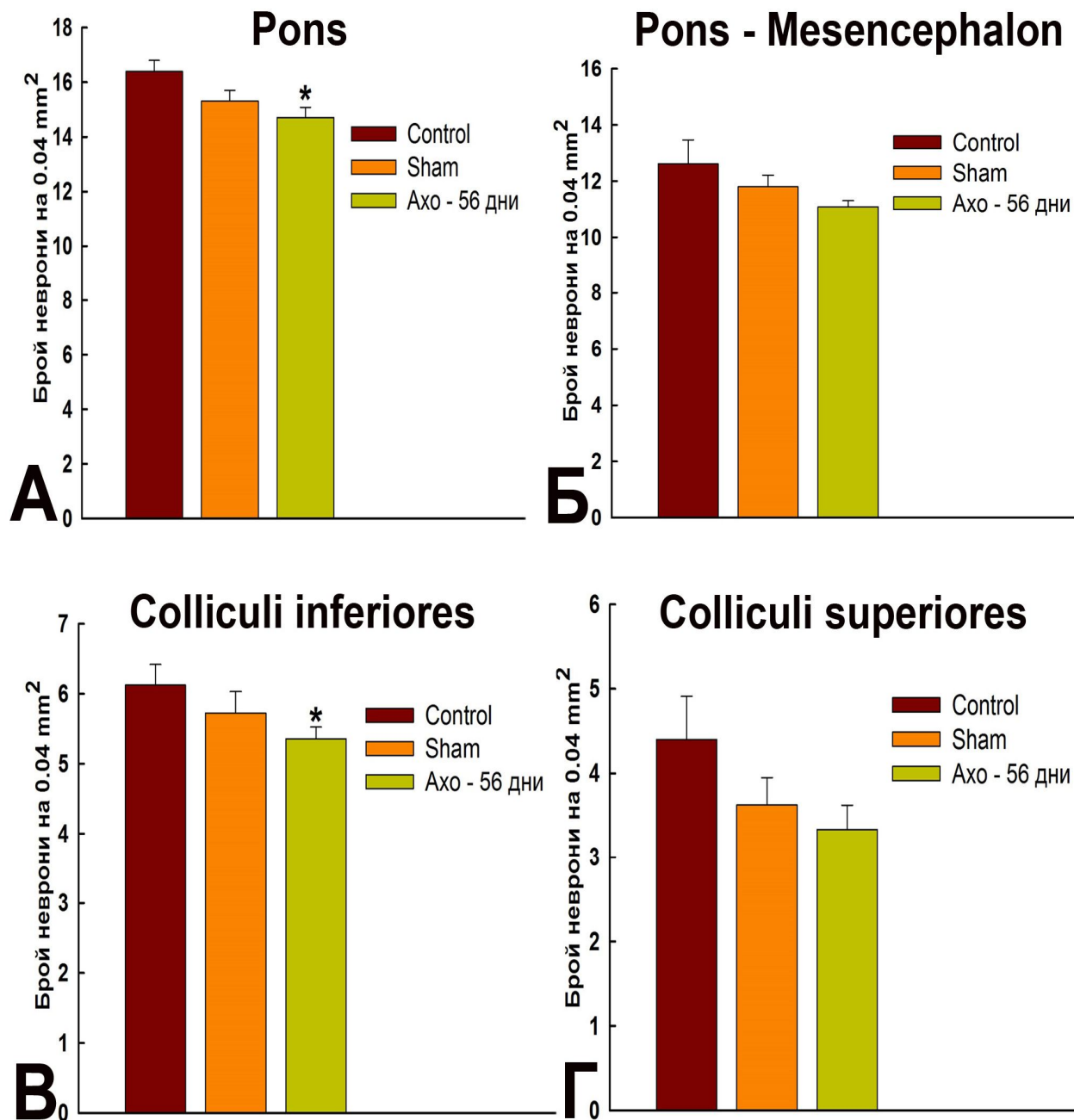
Фигура 5.31. Графично визуализиране на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомияните на 14 дни плъхове (Ахо – 14 дни) на ниво *pons* (А), *pons-mesencephalon* (Б), *colliculi inferiores* (В) и *colliculi superiores* (Г). Данните са сравнени със Student's t-test и демонстрират средната стойност и стандартната грешка (n=5). *p<0.05 спрямо контролната група; &p<0.05 спрямо фалшиво-оперираната група.



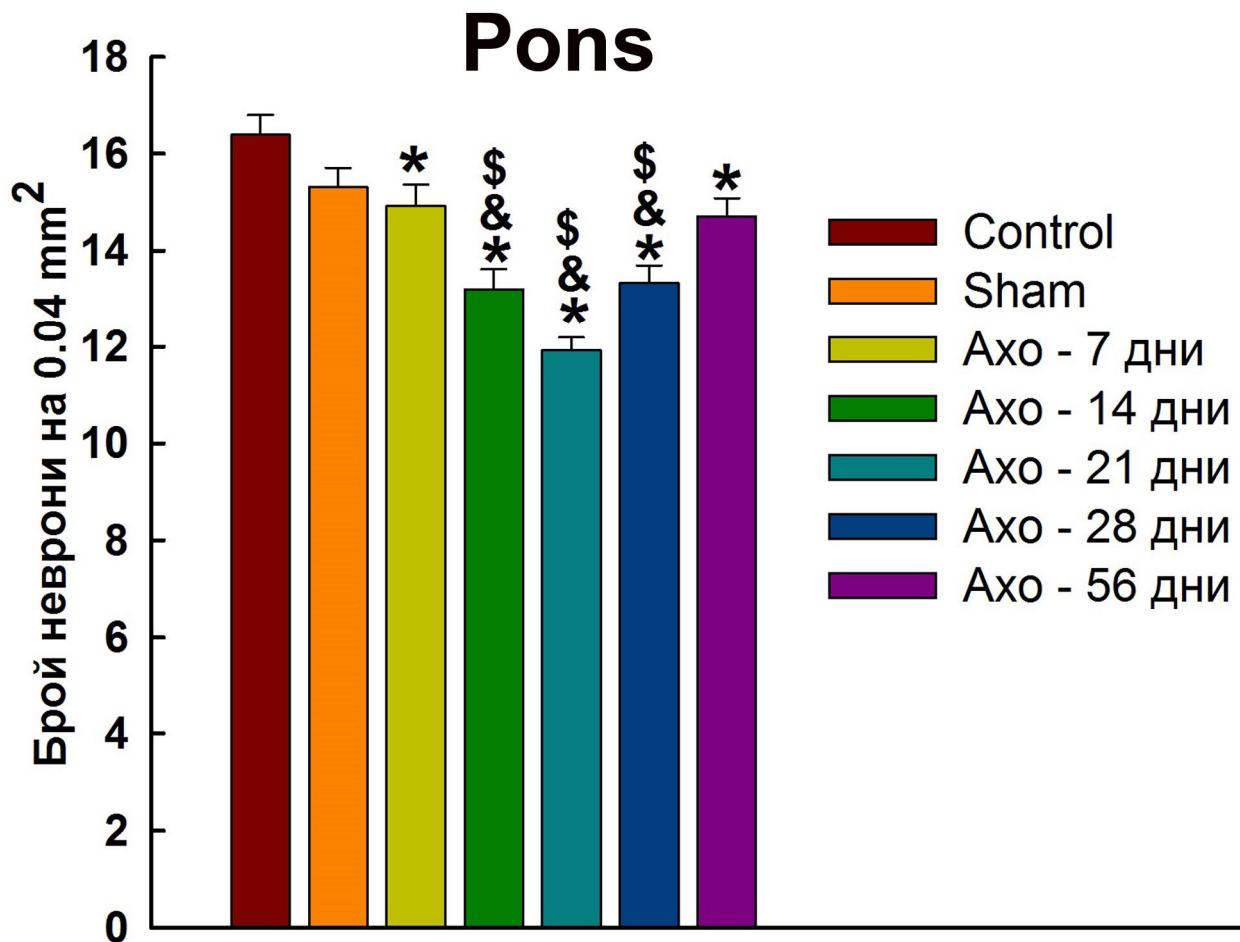
Фигура 5.32. Статистическо представяне на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомирани на 21 дни плъхове (Ахо – 21 дни) на ниво pons (А), pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (В) и colliculi superiores (Г). Данните демонстрират средната стойност и стандартната грешка (n=5). * $p < 0.05$ спрямо контролната група; & $p < 0.05$ спрямо фалшиво-оперираната група.



Фигура 5.33. Графично представяне на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомияните плъхове на 28 дни (Axo – 28 дни) на ниво pons (A), pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (B) и colliculi superiores (Г). Хистограмите представят средната стойност и стандартната грешка (n=5). * $p < 0.05$ спрямо контролната група; & $p < 0.05$ спрямо фалшиво-оперираната група.



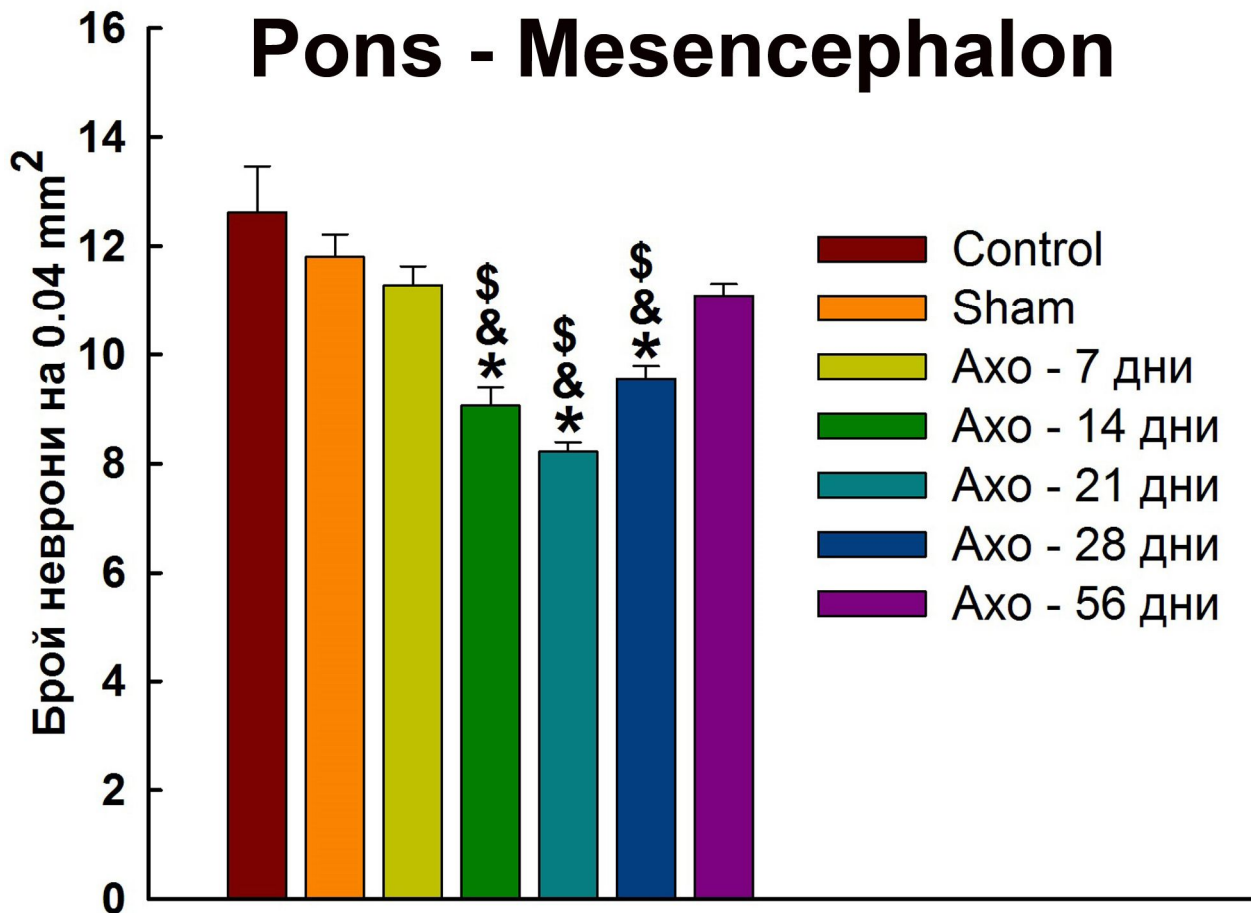
Фигура 5.34. Графично представяне на средния брой неврони на площ от 0.04 mm² при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомизираните плъхове на 56 постоперативни дни (Axo – 56 дни) на ниво pons (А), преходна зона pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (В) и colliculi superiores (Г). Данните демонстрират средната стойност и стандартната грешка (n=5). *p<0.05 спрямо контролната група.



Фигура 5.35. Статистическо представяне на средния брой неврони, на площ от 0.04 mm^2 , на ниво мост (pons) при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни) след оперативната интервенция. Данните представят средната стойност и стандартната грешка ($n=5$). * $p<0.05$ спрямо контролната група; & $p<0.05$ спрямо фалшиво-оперираната група; \$ $p<0.05$ спрямо Ахо – 7 дни.

При сравнително разглеждане на средния брой неврони, на единица площ от 0.04 mm^2 , на ниво pons от контролната и фалшиво-оперираната групи, както и при аксотомираните животни през различни периоди, установихме следните зависимости (фиг. 5.35). Не регистрирахме статистически значими различия ($p=0.062$) в средния брой неврони между контролната 16.393 ± 0.403 и фалшиво оперираната група 15.308 ± 0.399 . Средният брой неврони на единица площ на ниво pons намаляваше статистически значимо от 16.393 ± 0.403 при контролната група, на

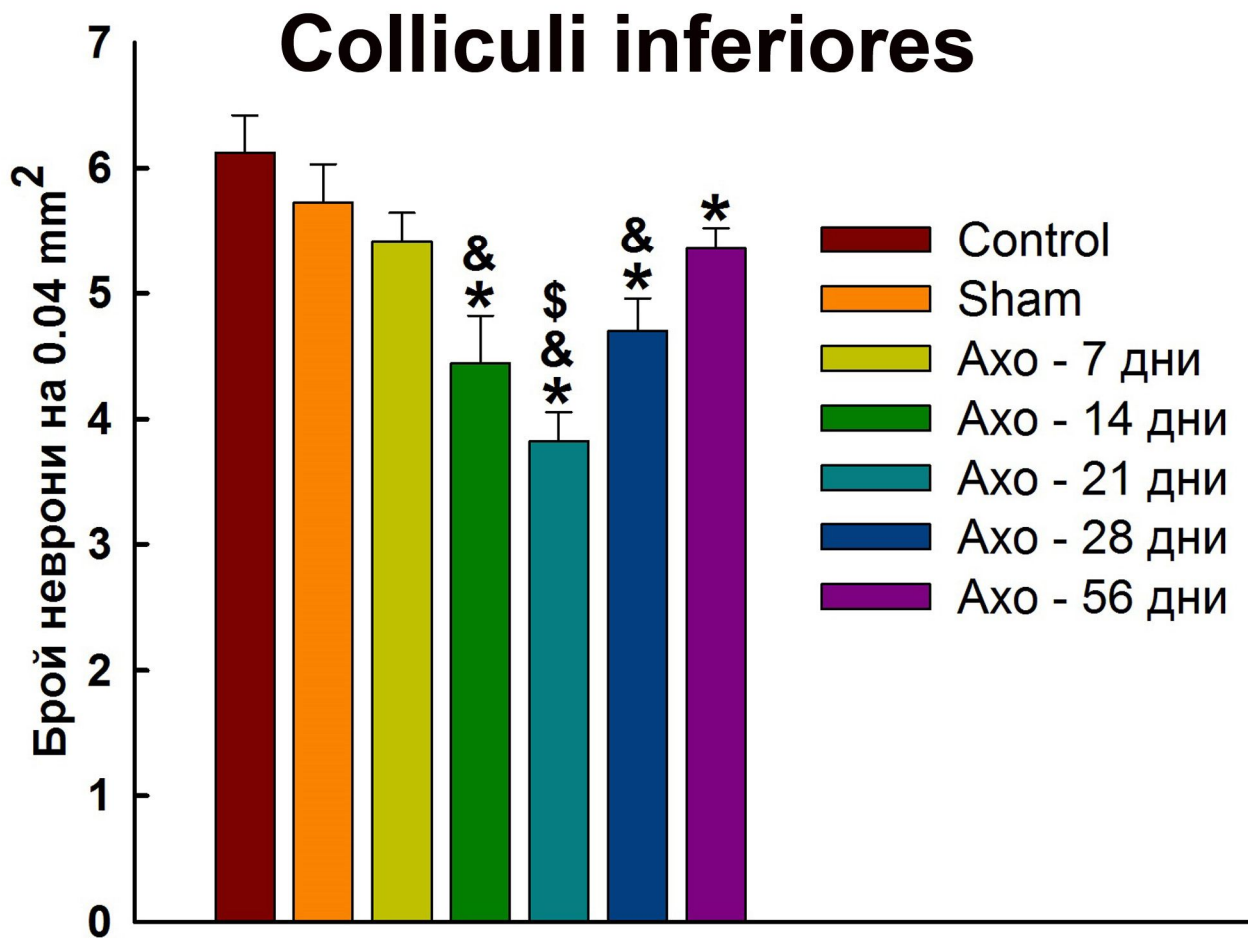
14.920±0.443 при Ахо – 7 дни, 13.200±0.416 при Ахо – 14 дни, 11.923±0.265 при Ахо – 21 дни и започваше плавно да се увеличава на 13.333±0.362 при Ахо – 28 дни и 14.710±0.369 при Ахо – 56 дни.



Фигура 5.36. Графично визуализиране на средния брой неврони на площ от 0.04 mm² на ниво преходна зона мост-среден мозък (pons-mesencephalon) при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни) след интервенцията. Данните отразяват средната стойност и стандартната грешка (n=5). *p<0.05 спрямо контролната група; &p<0.05 спрямо фалшиво-оперираната група; §p<0.05 спрямо Ахо – 7 дни.

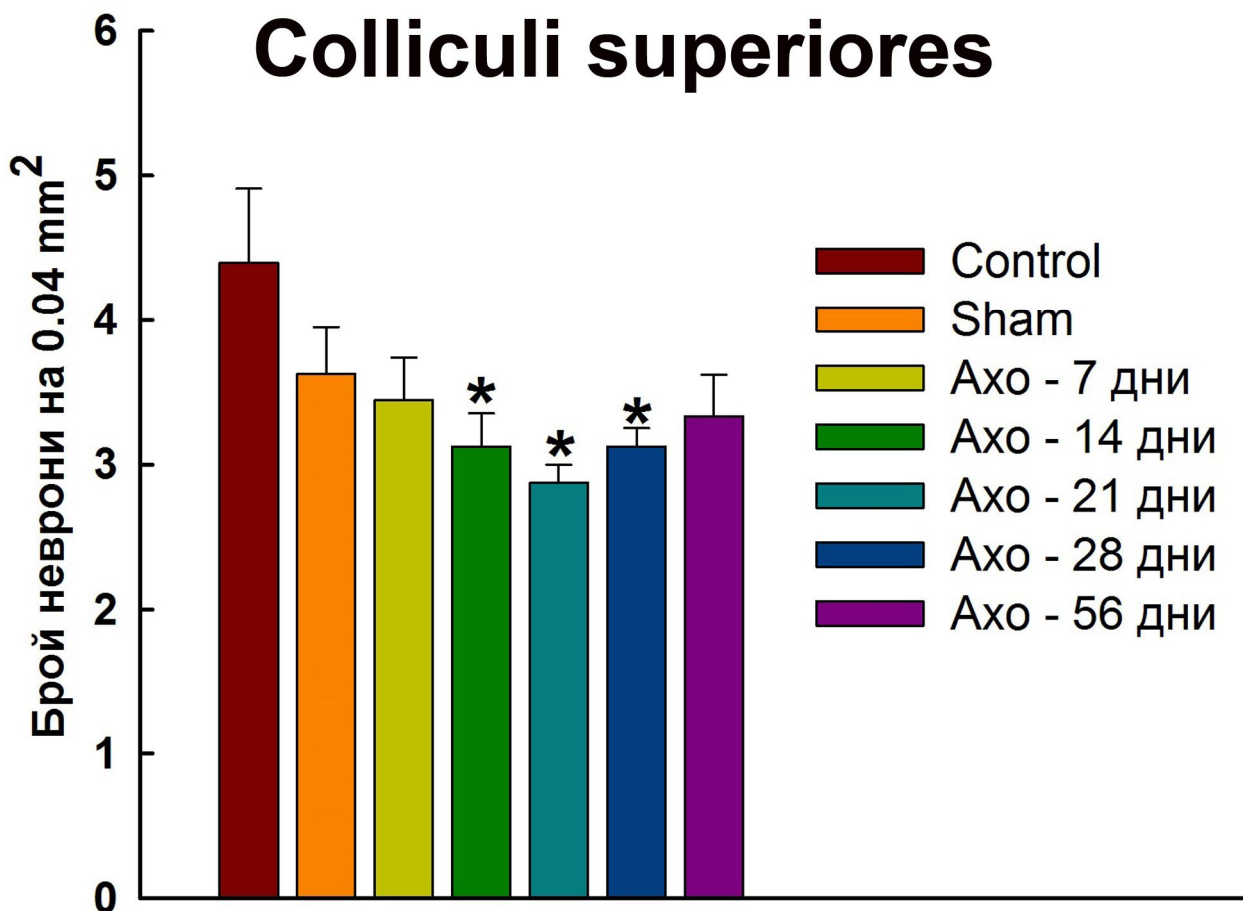
На ниво *pons-mesencephalon* средният брой неврони намаляваше статистически значимо (p<0.05) от 12.615±0.851 и 11.800±0.416 съответно при контролната и фалшиво-оперираната група на 9.063±0.335 при Ахо – 14 дни, 8.222±0.173 при Ахо –

21 дни, и започваше да се покачва на 9.550 ± 0.235 при Ахо – 28 дни (фиг. 5.36). При аксотомияните животни на 56 дни получавахме средна стойност 11.091 ± 0.211 , като тази стойност не бе статистически значима ($p > 0.05$), както спрямо контролната, така и спрямо фалшиво-оперираната група. При 14-, 21- и 28-дневни аксотомияни плъхове броят на невроните в Me5 в преходната зона бе значително намален, като тази разлика бе статистически значима спрямо Ахо – 7 дни (фиг. 5.36).



Фигура 5.37. Статистическо изобразяване на средния брой неврони на площ 0.04 mm^2 на ниво *colliculi inferiores* при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомияните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни). Хистограмите илюстрират средната стойност и стандартната грешка ($n=5$). * $p < 0.05$ спрямо контролната група; & $p < 0.05$ спрямо фалшиво-оперираната група и \$ $p < 0.05$ спрямо Ахо – 7 дни.

По-рострално в средния мозък на ниво *colliculi inferiores* невроналната загуба беше статистически значима при 14- и 21-дневните аксотомирани плъхове и бе съответно 4.444 ± 0.377 и 3.824 ± 0.231 в сравнение със стойностите при контролната 4.444 ± 0.377 и фалшиво-оперираната група 5.727 ± 0.304 . При групите Ахо – 28 дни и Ахо – 56 дни, въпреки че наблюдавахме покачване в броя на невроните съответно на 4.700 ± 0.260 и 5.357 ± 0.169 отново разликата беше съществена и статистически значима спрямо контролната група, а при Ахо – 28 дни и спрямо Sham-групата (фиг. 5.37).



Фигура 5.38. Графично илюстриране на средния брой неврони на площ от 0.04 mm^2 на ниво *colliculi superiores* при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни) след интервенцията. Данните изобразяват средната стойност и стандартната грешка ($n=5$). * $p < 0.05$ спрямо контролната група.

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

Още по рострално на ниво *colliculi superiores* средният брой неврони намаляваше статистически значимо ($p < 0.05$) от 4.000 ± 0.510 при контролната група на 3.125 ± 0.227 при Ахо – 14 дни, 2.875 ± 0.125 при Ахо – 21 дни и 3.125 ± 0.125 при Ахо – 28 дни (фиг. 5.38).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Една от забележителните особености на Me5 е неговата пластична природа. Данните от редица изследвания, датирани от края на ХХ век, недвусмислено показват че промените в околните условия водят до съпътстващи, отложени във времето и дълготрайни увреждания в морфологичния и неврохимичен фенотип на мезенцефалните тригеминални неврони. В отговор на тези външни промени Me5 невроните реагират с адаптивни изменения, които насочват тяхната активност в посока на преживяване и регенериране на регистрираните увреждания в структурата и невротрансмитерната им принадлежност. Понастоящем е добре известно, че централната и периферна нервна увреда изменя невроналния фенотип от обичайния му статус на междуневронална синаптична сигнализация и комуникация към регенеративно състояние, включващо down- и up-регулация на многобройни клетъчни компоненти и *de novo* синтеза на някои биологично активни вещества, които не се експресират във възрастните неврони при нормални околни обстоятелства. Тези промени по всяка вероятност са свързани с изграждане на адекватен морфологичен и неврохимичен клетъчен отговор на нервната увреда (Navarro et al., 2007).

6.1. Структурна пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони

Резултатите от нашето изследване показват че едностранното прекъсване на периферен нерв, *n. massetericus*, предизвиква развитието на забележими морфологични промени в клетъчните тела и израстъците на увредените мезенцефални тригеминални неврони. Те се манифестират основно с хроматолиза и трансневронална дегенерация на засегнатите перикариони, но също така и с дегенерационни промени в дисталните участъци на прекъснатия периферен нерв. Тази дегенерация е относително ранна клетъчна реакция, тя се визуализира като начален признак на морфологична увреда, далеч преди да се регистрира клетъчна загуба, но впоследствие като краен резултат може да доведе до значителна

невронална загуба. Последната лесно може да бъде визуализирана на основата на наблюдаваните очевидни промени в ядърцето, които са следствие от периферната нервна лезия. Тези промени са полезен маркер за различаване на преживелите неврони и, по тази причина, броенето на ядърцата у аксотомияните и интактни неврони може да служи за надежден метод за сравнение и разпознаване на преживели и загинали нервни клетки в нормалните и експериментални животни (Raappana and Arvidsson, 1992). Нашите данни потвърждават първоначалните анатомични находки в ядрото, които засвидетелстват че лезиите на Me5 или мезенцефалния тригеминален тракт причиняват дегенерация на влакната на нервите, инервиращи дъвкателните мускули и показват как тези лезии водят до хроматолиза на мезенцефалните тригеминални неврони (Allen, 1919; Corbin, 1940; Szentágothai, 1948; Dault and Smith, 1969). Тази морфологична констатация се подкрепя и от ранни ултраструктурни изследвания демонстриращи наличие на индуцирани от аксотомията дегенериращи и некротични Me5 неврони (Imamoto, 1972). Впоследствие по-нови изследвания потвърждават, че мезенцефалните тригеминални неврони са твърде чувствителни на периферна нервна увреда, и развиват дегенеративна аргирофилия, която води до забележима клетъчна смърт (Raappana and Arvidsson, 1992; Ichikawa et al., 2007). Подобни промени са установени в тригеминалните ганглийни клетки у плъх след прекъсване на *n. infraorbitalis* скоро след интервенцията и се афишират с ретроградна дегенерация на техните клетъчни тела, наречена трансганглионарна дегенерация (Aldskogius and Arvidsson, 1978).

Предишно количествено изследване на Me5 у плъх демонстрира, че периферната аксотомия на *n. massetericus* причинява известна (10.5-22.7%) редукция в броя на увредените мезенцефални тригеминални неврони и че повечето от тях загиват в периода между 10-ти и 30-ти постоперативен ден (Raappana and Arvidsson, 1992). Нашите морфометрични изследвания показват подобна тенденция и доказват че тя е общовалидна за цялото ростокаудално протежение на ядрото. Данните от преброяването на отделните сегменти на Me5 – мостова част, преходна зона между мост и среден мозък, на ниво *colliculus inferior* и ниво *colliculus superior*

в средния мозък подчертават безспорната констатация, че броят на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони, сравнени с този на невроните на интактната страна и при лъжливо оперираните експериментални животни, започва да намалява 7 дни след оперативната интервенция и продължава плавно да се снижава до края на третата седмица след нея. Това снижение в броя на увредените Me5 неврони е статистически значимо за всеки Me5 сегмент в рамките на този времеви диапазон. В края на първия месец след периферната аксотомия се забелязва тенденция на сметлинномикроскопска визуализация на сравнително по-голям брой на мезенцефални тригеминални неврони на страната на увредата, но те все още са по-малко, отколкото са регистрираните на този етап неврони в контролните животни. В края на втория месец след експерименталното прекъсване на периферния нерв броят на наблюдаваните преживели неврони се доближава до този, регистриран в края на първата постоперативна седмица. Този феномен без съмнение се дължи не на възстановяване (чрез регенерация) на броя на аксотомираните мезенцефални неврони, а на факта, че те по всяка вероятност не могат да бъдат визуализирани с методите, приложени в това изследване.

Добре известно е като основен постулат в невробиологията, че нервните клетки заплащат своята висока специализация със загуба на способността си за постнатално делене. Независимо че през настоящия век се натрупаха достатъчно убедителни доказателства за разколебаване на тази догма, поне в отделни зони като *hippocampus* и *bulbus olfactorius* на крайния мозък у гризачи и примати (наскоро обобщени в Lepousez et al., 2015), преки доказателства на адултна неврогенеза в тази мозъчна област, все още не са приведени. Логично обяснение на феномена за визуализация на по-голям брой неврони в края на втория месец след аксотомията, можем да намерим във факта, че след първата седмица, последваща оперативната интервенция, мезенцефалните тригеминални неврони показват очевидни признаци на невронална дегенерация. Те включват на първо място дезинтеграция на гранулирания EP (електронномикроскопски еквивалент на Нисловите грануляции), която резултира в загуба на тинкториалните способности на цитоплазмата за оцветяване с крезил виолет по метода на Nissl, който се използва широко от

изследователите за изследване на морфологията и хистопатологията на нервната тъкан. Очевидно е, че през периода между втора и четвърта седмица след периферната аксотомия част от увредените мезенцефални тригеминални неврони не могат да се визуализират с този метод и да бъдат наблюдавани под светлинен микроскоп. След задействане на защитните механизми в засегнатите неврони през втория месец след увредата на периферните им израстъци, те постепенно възстановяват поне една част от гранулирания ЕР и техните присъщи способности за активен протеинов синтез. Следователно те могат отново да бъдат оцветени с приложения оцветителен метод и да бъдат визуализирани с конвенционални хистологични и имунохистохимични методи. Наблюдаваните от нас промени подкрепят констатацията на Raappana и Arvidsson (1992), че пикът на невронална загуба е между втора и четвърта постоперативна седмица. В подкрепа на това предположение може да се отчете и факта, че времевият период на най-голяма невронална загуба хронологично съвпада с времето, когато се проявяват най-значителните промени в нивото на невроактивните вещества, експресирани от аксотомираните Me5 неврони (Umemoto et al., 1994; Yoshida et al., 1995; Lazarov et al., 1999; Lazarov and Dandov, 2000). Тези данни ни дават основание да заключим, че процесът на адаптация към променените околни условия се съпровожда със значима клетъчна загуба. В този смисъл твърде вероятно е аксонални сигнали, индуцирани от нервната увреда да активират някои сигнални пътища на гени в невроналните клетъчни тела, които биха могли да доведат до първата от двете възможни противоположни последици – клетъчна смърт или регенераторен отговор на увредените неврони, водещ до тяхното преживяване. От друга страна в предишни изследвания са приведени убедителни доказателства, че периферната нервна увреда „принуждава” преживелите мезенцефални тригеминални неврони да модифицират своята обичайна активност като я превключат от състояние на поддържане на нормалните клетъчни функции и невротрансмисия към необичайни адаптационни феномени като регенерация и преживяване (Lazarov, 2007; Dandov et al., 2016). Има данни също така, че промените, индуцирани от нервната увреда включват и повишени невротрофни изисквания (Ichikawa et al., 2007).

6.2. Неврохимична пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони

Добре известно е, че тригеминалните първични сетивни неврони се нуждаят от невротрофини в хода на тяхното ембрионално и ранно постнатално развитие, но с възрастта те съзряват и стават все по-малко зависими от присъствието на невротрофни сигнали. За тяхното оцеляване в необичайни околни условия обаче те се нуждаят от изграждане на способности да отговарят адекватно на променената среда и чрез експресия на други растежни и регулаторни сигнали като невротрансмитери и неuropeптиди. Ролята на тези невроактивни субстанции като поддържащи фактори е будела непрекъснато интереса на невробиолозите, тъй като днес е общоизвестно че те споделят общи сигнални пътища с растежните фактори и прото-онкогените с цел регулиране на невроналната пролиферация, миграция, преживяване, нарастване, диференциация и генна експресия (Lipton and Kater, 1989).

Нашите настоящи резултати показват забележителна химична пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони, която се проявява като разнопосочна (в насока свръхекспресия или снижение) промяна в нивото на основни трансмитери в Me5, доказано действащи при нормални условия, както и чрез новосинтезиране на определени неuropeптиди в условията на аксотомия. Данните от редица изследвания са показали недвусмислено, че някои невротрансмитери и неuropeптиди не само опосредстват краткосрочното транссинаптично предаване на информацията, но могат също така да действат като дългосрочни морфогенетични сигнали и трофични фактори, които подпомагат невроналния растеж, пластичност и преживяване (Lipton and Kater, 1989; Copray and Liem, 1993).

Изследването на невротрансмитерната пластичност на първичните сетивни неврони бележи своя пик в края на миналото столетие, когато редица изследователски групи посвещават значителни усилия в проучвания на този феномен в различни животински видове. Данните от редица имунохистохимични и хибридохистохимични изследвания са разкрили промените в нивото на експресията на невротрансмитерите от нервните клетки при нормални условия невронални калций-

свързващи протеини и газови трансмитери след прерязване на периферен нерв (Arvidsson et al., 1994; Umemoto et al., 1994; Yoshida et al., 1995; Wakisaka et al., 1996; Larsen et al., 1997; De Gandarias et al., 1999). В нашето проучване, ние за пръв път установяваме понижен имунореактивитет (намален брой на имунопозитивни неврони и снижен интензитет на имунооцветяване) на глутамат в аксотомирани Me5 неврони. Предишни изследвания недвусмислено са показали, че тази възбудна аминокиселина е основен кандидат за невротрансмитер в мезенцефалните тригеминални неврони на плъх (Coprav et al., 1990b), морско свинче (Chandler, 1989) и котка (Lazarov, 2000; Lazarov and Dandov, 2000). Резонно обяснение на наблюдаваната от нас понижена експресия на глутамат бихме могли да намерим в посоченото по-горе функционално обстоятелство че периферната нервна увреда предизвиква пренасочване активността на увредените неврони от невротрансмисия към преживяване и регенерация на техните израстъци. В този смисъл логично е да се приеме, че нивото на невротрансмитерите, играещи главна роля при предаване на нервните сигнали между невроните при нормални условия, видимо се снижава при промяна в околната среда когато усилията на увредените неврони се насочват към тяхното оцеляване чрез минимизиране на обичайните им дейности. Това заключение би могло да се екстраполира и за други, изследвани в настоящето проучване атипични трансмитери като газовата молекула азотен оксид, за които има достатъчно данни, вкл. от предишни наши изследвания, че се експресират от мезенцефалните тригеминални неврони при обичайни околни условия (Lazarov and Dandov, 1998; Stoyanova and Lazarov, 2005a). В потвърждение и допълнение на това, 4-6 дни след прерязване на *n. infraorbitalis* е установено увеличение в броя на NADPH-диафороза-съдържащите мезенцефални тригеминални неврони (De Gandarias et al., 1999). Подобни данни са получени и след прилагане на едностранна периферна аксотомия на *n. massetericus* у плъх – три дни след интервенцията мезенцефалните тригеминални неврони показват NADPH-диафороза-позитивност, достигайки максимален брой на реактивни Me5 неврони на 7-ия ден след аксотомията и поддържайки този висок брой до 8-ма постоперативна седмица, докато максималният брой индуцирани от аксотомията NOS-имунореактивни

неврони се запазва до две седмици след интервенцията и в рамките на четири седмици след нея нитрергичните неврони отново изчезват (Varathan et al., 2001). Нашите резултати напълно подкрепят тази тенденция на ранно (в рамките на една седмица след периферната аксотомия) увеличаване броя на NADPH-диафоразо-реактивните мезенцефални тригеминални неврони, персистиране на нитрергичните неврони до края първия месец след интервенцията и бавното им връщане към интактното състояние до края на втори постоперативен месец. Този феномен би могъл да се обясни с предположението, че постоянно повишеното ниво на NOS в Me5 неврони се дължи на бавно прогресиращата невронална клетъчна смърт след периферната нервна увреда, тъй като тя е логичен изход от засилената чувствителност на невроните към калций-медирана невротоксичност при неблагоприятните околни условия. Алтернативно, бихме могли да спекулираме че възможната ендогенна продукция на азотен оксид е в основата на защитен механизъм на невроните срещу нервната увреда и по такъв начин да се подпомогне преживяването и регенерацията на мезенцефалните тригеминални неврони.

По-нови изследвания върху химичната пластичност на тригеминалните първични аферентни неврони са разкрили, че аксотомията на *n. alveolaris inferior* предизвиква значително намаляване на нивото на два „сетивни” невропептида, SP и CGRP, в перикарионите на увредените тригеминални ганглийни клетки у пор (Elcock et al., 2001). В нашето изследване ние не успяхме да установим индуцирана от аксотомията експресия на тези два пептида в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони при плъх. В тази връзка трябва да подчертаем, че в горепосоченото изследване двата пептида са визуализирани в малките и средни по размери ганглийни клетки, където те се приемат за маркери на немиелиновите или тънките миелинови първични ноцицептори, а мнозинството Me5 неврони са големи по размери и проприоцептори по функционална модалност. Друго възможно обяснение за тази негативна находка, освен междувидови различия, бихме могли да потърсим в предположението, че *de novo* синтезата на SP и CGRP е твърде слаба и/или тези протеини се транспортират твърде бавно за да бъдат могат да бъдат детектирани с имунохистохимични методи. Прилагането на хибридохистохимия би

могло да даде по-конкретни данни да наличието на тези пептиди в засегнатите Me5 неврони, поне на иРНК ниво, а блокирането на аксоплазменния ток с колхицин би повишило възможността за визуализацията им и на протеинно ниво. Подобни позитивни находки за експресия на CGRP, но не и на SP, в близо 20% от периферно аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони у плъх са докладвани от други автори (Yoshida et al., 1995). Чрез трасиране с Fluorogold на проекциите на прекъснатия периферен нерв, приложено от тези изследователи, те са успели да демонстрират, че и двата типа първични проприоцептори, инервиращи дъвкательните мускулни вретена и периодонталните пресоцептори, ир-регулират синтеза на CGRP.

От друга страна, резултатите от настоящето проучване недвусмислено разкриват, че мезенцефалните тригеминални неврони, които обичайно в нормални условия не синтезират невропептиди, като следствие от периферна нервна аксотомия започват да експресират други невропептиди на иРНК и протеинно ниво, които функционално са приети за инхибитори на сетивната трансмисия. Това се отнася както до участие в този процес на невроните, преимуществено ограничени в мостовата част на Me5, които инервират периодонталната връзка и са приети за пресорецептори, така и до тези, разпръснати из цялото ядро, които са свързани с инервацията на дъвкательната мускулатура. Нашите данни показват, че прерязването на периферен нерв индуцира имунореактивност към NPY, GAL и VIP в мезенцефалните тригеминални неврони у плъх една седмица след аксотомията и тази експресия достига максимален интензитет две седмици след травмата. Тези и предишни наши резултати (Dandov et al., 2005, 2010) допълват данните на други автори (Umamoto et al., 1994), които установяват експресия за VIP в увредените Me5 неврони на иРНК, но не и на протеинно ниво, както подкрепят и находките от последващи експерименти на Larsen и сътр. (1997), които демонстрират ранна експресия в аксотомирани мезенцефални тригеминални неврони на друг пептид от семейството на VIP – PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), при това в коекзистенция с NPY и GAL. Подобна травматично предизвикана невропептидна експресия е демонстрирана хронологично и в аксотомирани

спинални ганглийни неврони у плъх (Noguchi et al., 1993). Авторите подчертават, че имунореактивни са големите по размери спинални ганглийни клетки, които функционално се приемат за проприоцептивни. Установеният от нас времеви период на невропептидна *de novo* синтеза отговаря и на установените промени в невропептидното иРНК и протеинно съдържимо на Me5 у котка (Lazarov, 2000, 2002, 2007), както и на докладвания преди от други автори неврохимичен отговор на аксотомия в Me5 у плъх (Umemoto et al., Yoshida et al., 1995). Той включва начало на т.нар. пептидна up-регулация между 1-ви и 3-ти постоперативен ден и продължителен пик между 2-ра и 4-та седмица след интервенцията. На по-късен етап след нея, значителното повишение в пептидните нива персистира до 28-ми постоперативен ден, последвано от видима, бавна, но постоянна пептидна down-регулация (Arvidsson et al., 1994). В нашето изследване ние регистрирахме връщане на пептидните нива близо до контролното ниво 56 дни след периферната нервна увреда. Съпоставяйки тези данни с резултатите от горепосочените изследвания, изглежда вероятно PACAP да участва в ранния невронален отговор към нервна увреда и неговият начален адаптационен ефект да се продължава от включване на по-късен етап на други новосинтезирани пептиди като NPY и GAL.

Тези данни ни дават основание да заключим, че включването на невропептиди в устно-лицевата проприоцепция се проявява само в абнормални условия и този феномен е валиден за всички първични аферентни неврони. Очевидно експресията на невропептиди в мезенцефалните тригеминални неврони е пластична и като последица от увреда на периферен нерв проприоцептивните неврони в Me5 могат да up-регулират тези пептиди. Какво е функционалното значение на този феномен и каква е конкретната му корелация с клетъчната смърт предстои да бъде изяснено.

Добре известен факт в синаптологията е, че освобождаването на трансмитера от аксоналното окончание в синапса трябва да се компенсира от неговата *de novo* синтеза в перикариона му (Navarro et al., 2007). Ето защо, логично е да се приеме, че невропептиди като SP, които нормално участват в сетивната трансмисия се потискат при селективна аксотомия, докато експресията на пептидите, които служат като трофични фактори, се индуцира от аксотомия и те участват активно в

ответния отговор към увреда и в процеса на невронална регенерация (Nielsch and Keen, 1989). Изглежда вероятно супресията на сетивната сигнална трансмисия и down-регулацията на възбудните невротрансмитери да е насочена към минимизиране на ефекта на периферна нервна увреда. Ние считаме освен това, че новосинтезираните невропептиди биха могли да играят и поддържаща роля в адаптивния процес като своеобразни невротрофни фактори, продуцирани в отговор на увредата, като по такъв начин те протектират аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони. Без съмнение, същинските невротрофини като растежни фактори са включени в регулацията и поддръжката на фенотипа и морфофункционално състояние в зряла възраст. В подкрепа на това предположение е безспорно установеното им наличие в над 60% от мезенцефалните тригеминални неврони у възрастен плъх (Jacobs and Miller, 1999), което подсказва твърде вероятното им участие в процеса на преживяване на мезенцефалните тригеминални неврони. Понастоящем е известно, че допълнителното ендогенно прилагане на невротрофини може да усилва регенераторния отговор на периферно аксотомирани неврони (Navarro et al., 2007), но тяхната конкретна роля в този процес в Me5 предстои да бъде изследвана в бъдеще.

Индуцираните от аксотомията неврохимични изменения включват променен Me5 профил и на изследваните от нас невронални калций-свързващи протеини. Тази промяна е свързана основно с нивото на парвалбумин, и в по-малка степен, това на калбиндин. След латентен период от няколко дни, адаптивният отговор на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони включва забележимо понижение в нивото на парвалбумин, и по-слабо снижение на калбиндин. Липсата на промяна в началните дни би могла да се обясни с факта, че е нужно известно време след увредата за да може настъпилите промени да надхвърлят прага за тяхното имунохистохимично регистриране. От края на първата седмица тяхното ниво продължава да спада в сравнение с интактните мезенцефални тригеминални неврони и през втората постоперативна седмица то е забележимо по-ниско спрямо нивото им в Me5 неврони в контролната група. Тези данни са в съгласие с резултатите от предишни изследвания на ефекта на периферна аксотомия върху

нивото на калций-свързващите протеини в Me5 у плъх (Wakisaka et al., 1996), и съвпадат с описаните първоначални промени в аксотомираните Me5 неврони и у други животински видове (Lazarov, 2000, 2007). При котка обаче нивото на тези калций-свързващи протеини се запазва непроменено през първата седмица след аксотомията и се понижават видимо едва през втората постоперативна седмица (Lazarov et al., 1998). Подобни промени обаче не са установени в невроните на спиналните ганглии след прерязване на периферни соматични или увреда на висцерални нерви (Honda, 1995; Medici и Shortland, 2015) По всяка вероятност, тези несъответствия се дължат на междувидови различия, но има и някои спекулации, потвърдени от предварителни експериментални данни (Raappana and Arvidsson, 1992), че *n. massetericus* е по-уязвим на увреда в сравнение с *n. alveolaris inferior*, който нерв върви през калцифицирана тъкан в костен канал.

Дискусионните интерпретации повдигат резонния въпрос дали установените от нас неврохимични промени са пряко следствие на намаление в броя на Me5 неврони, експресиращи тези протеини и/или се дължи на намален интензитет на тяхното имунооцветяване след периферната аксотомия. Изхождайки от демонстрираните от нас морфологични промени, можем да заключим, че и двата механизма допринасят за този феномен. Функционалната интерпретация на набелязаните неврохимични промени изисква обаче друг подход. Тъй като и двата изследвани калций-свързващи протеини са локализиращи в големи по размери първични сетивни неврони, една субпопулация с известно високо калциево съдържимо, изглежда логично да предположим че тези протеини играят роля в буферизиране на вътреклетъчния калций, както допуска Blaustein (1988). Налице са също така доказателства, че калций-свързващите протеини могат да функционират като вътреклетъчни калциеви транспортери или като буферизираща система за клетъчна протекция на невроналната активност при нормални условия (Baimbridge et al., 1982; Celio, 1990). Така например, Wakisaka и др. (1996a) допускат че калбиндин е включен в калций-буферизиращите механизми в сетивните ганглии след периферна увреда. Нещо повече, неговото включване в този процес се съпровожда с поява на NPY-имунореактивност в тригеминалните първични аферентни неврони,

където калциевата регулация е от особено значение (Sasaki et al., 1994). В тази връзка Wakisaka и сътр. (1996a) установяват частична коекзистенция между калбиндин и NPY в тригеминални ганглийни клетки у плъх, където и двете невроактивни вещества участват в буферни механизми за калциеви йони в увредените първични сетивни неврони. Сходна функционална интерпретация на подобни находки са направени от същия изследователски екип в друго изследване върху Me5 (Wakisaka et al., 1996b). Генералният извод, който бихме направили от анализа на горепосочените данни е, че промените в експресията на калций-свързващите протеини могат да бъдат отнесени към постигане на адекватен клетъчен отговор, тъй като чувствителността на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони към вътреклетъчната калциева концентрация изглежда се различава от тази на интактните Me5 неврони. В крайна сметка, може да се приеме че намалените нива на калций-свързващи протеини, наред с новосинтезирания NPY допринасят за преживяването на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони в процеса на адаптация след периферна аксотомия.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БЪДЕЩИ НАСОКИ

Анализирайки горепосочените данни, можем да обобщим че мезенцефалното тригеминално ядро е уникална мозъчна структура с необичайна централна локализация и забележителна способност за адекватен адаптивен морфологичен и неврохимичен отговор на промени в заобикалящата го среда.

Мезенцефалните тригеминални неврони реагират на увреда на периферен нерв със значителни структурни промени в техните перикариони и периферните им израстъци, които са насочени към преживяване и невронална регенерация в условията на променената околност. Нещо повече, измененията в околните условия променят и неврохимичния профил на мезенцефалните тригеминални неврони, което ясно показва, че нивото на трансмитерните вещества в тях не е статично, а варира значително и се променя в съзвучие с променената околна среда. В резултат на това, невроналният морфологичен и неврохимичен фенотип се променя драстично, което в крайна сметка води до адекватен адаптационен отговор. Тази пластична реорганизация в ядрото се базира на нормалните физиологични способности на нервните системи да модифицират ефикасността и разпространето на връзките в една по-широка невронална мрежа (Navarro et al., 2007), която може да бъде приведена в действие от патологични сигнали от периферията. Детайлният механизъм, по който тези сигнали действат, предстои да бъде изяснен. Засега се знае, че аксоналните сигнали, индуцирани в отговор на нервната увреда, активират сигнални пътища на някои гени в невроналните клетъчни тела, които могат да доведат до две противоположни последици за невроните – клетъчна смърт или регенераторен отговор. По кой от тези пътища те ще поемат и докъде ще стигнат зависи от изградената адаптивна способност на увредените неврони.

Морфофункционалните и неврохимични промени илюстрират удивителната интерактивна природа и забележителната, неподозирана досега, невронална пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони. Промененият им след периферна нервна аксотомия и регистрираният по подходящ начин фенотип може

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

да намери частично обяснение в уникалната им ектопична мозъчна локализация и функционалната им роля в проприцептивната сетивност на устно-лицевата област. Изглежда твърде вероятно това необичайно разположение на клетъчните тела на мезенцефалните тригеминални неврони в ЦНС да е от значение за адекватната им реакция на периферна нервна увреда, както са предположили Raarranna и Arvidsson (1992).

VIII. ИЗВОДИ

На основата на оригиналните находки при това изследване, съпоставяйки ги с известните литературни данни за Me5, направихме следните по-важни **изводи**:

1. Невроналната популация в мезенцефалното тригеминално ядро у плъх е силно чувствителна на периферна нервна увреда и показва ясно изразена структурна и неврохимична пластичност.
2. Периферната аксотомия предизвиква динамични, с отложено начало и дългосрочно хронологично протичане морфологични промени и изменения в неврохимичния фенотип на увредените мезенцефални тригеминални неврони.
3. Адаптационните морфологични феномени включват количествена и качествена структурна промяна на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони.
4. Количествените изменения се изразяват в забележима и статистически значима невронална загуба на страната на увреждането в сравнение с броя на невроните в интактната страна на ядрото.
5. Качествените промени в Me5, предизвикани от периферното нервно прерязване се проявяват с трансневронална дегенерация и хроматолиза на перикарионите на аксотомираните неврони, и дегенерация на техните периферни израстъци.
6. Индуцираните от аксотомията промени в неврохимичния фенотип се изразяват в понижена активност (down-regulation) на нормално експресиращите се в ядрото класически трансмитери (глутамат) и невронални калций-свързващи протеини (парвалбумин и калбиндин), повишена активност (up-regulation) на газовия трансмитер азотен оксид, и *de*

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

ново синтеза на някои невроактивни пептиди (NPY, GAL и VIP) от увредените мезенцефални тригеминални неврони.

7. Новосинтезираните протеини участват в орофациалната проприоцепция само в необичайно променени условия на околната среда. По всяка вероятност те подтискат на пресинаптично ниво трансмисията на абнормално променените в резултат на периферната нервна увреда неврони.
8. В хронологичен порядък установените морфологични и неврохимични промени в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони се манифестират в края на първата постоперативна седмица, персистират до края на четвъртата седмица и бавно започват да отшумяват за да се върнат до обичайното си състояние и ниво в тях към края осма седмица след оперативната интервенция.
9. Морфологичните промени в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони са важно тяхно адаптивно свойство, насочено към преживяването им в условията на променена околна среда. Неврохимичните промени са друг релевантен фактор за преживяването на аксотомираните мезенцефални неврони и също допринасят за регенерацията на техните аксони в хода на адаптационния процес.

IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ

1. Проведено е комплексно проучване и са документирани в хронологичен порядък морфологичните и неврохимични адаптационни промени в мезенцефалните тригеминални неврони на плъх след експериментално едностранно прерязване на периферен нерв.
2. Установено е, че адаптационните промени в Me5 се манифестират още през първата седмица след увредата, персистират в продължение на две седмици и отшумяват към края на втория месец след интервенцията.
3. Индуцираните от периферната аксотомия промени в неврохимичния фенотип на увредените мезенцефални тригеминални неврони включват понижено ниво на експресия на глутамат и калций-свързващите протеини парвалбумин и калбиндин, повишена реактивност за NADPH-диафораза и *de novo* синтеза на галанин, невропептид Y и вазоактивен интестинален пептид.
4. Новосинтезираните след аксотомия невропептиди вероятно играят невротрофична роля за мезенцефалните тригеминални неврони и допринасят за тяхното преживяване при неблагоприятни околни условия.
5. Пониженото ниво на калций-свързващите протеини в мезенцефалните тригеминални неврони е своеобразна буферираща система за клетъчна протекция в отговор на нервната увреда.
6. Мезенцефалното тригеминално ядро у плъх показва признаци на забележителна структурна и неврохимична пластичност на неговата невронална популация, качество присъщо на всички първични сетивни неврони.

ПОТВЪРДИТЕЛНИ ПРИНОСИ

1. Мезенцефалното тригеминално ядро у плъх е силно чувствително към увреда на периферните израстъци на неговите неврони.
2. Реакцията на мезенцефалните тригеминални неврони на периферно нервно прерязване включва трансневронална дегенерация на техните перикариони и Валерова дегенерация на аксоналните им израстъци.
3. Периферната аксотомия предизвиква експресия на невропептиди и техните иРНК в телата на увредените мезенцефални тригеминални неврони.
4. Нивото на невроналните калций-свързващи протеини в мезенцефалните тригеминални неврони на плъх значително се понижава след прерязване на техните периферни израстъци.
5. Променените нива на изследваните невроактивни вещества играят роля в адаптивните процеси на мезенцефалните тригеминални неврони към периферна нервна увреда.

Х. ПУБЛИКАЦИИ
ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Dandov A**, Draganov M, Lazarov N (2005) Synthesis of galanin and neuropeptide Y in the rat mesencephalic trigeminal nucleus after injury of n. massetericus. *Trakia Journal of Sciences* **3**: 1–5.
2. **Dandov A**, Penkova Zh, Lazarov N (2010) *De novo* expression of neuropeptides in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after masseteric nerve injury. *Acta morphologica et anthropologica* **15**: 27–30.
3. **Dandov AD**, Atanasova DY, Lazarov NE (2016) Morphological changes in the rat mesencephalic trigeminal nucleus following peripheral axotomy. *Comptes Rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, in press. **IF2014: 0.284**

XI. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ

ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Dandov A**, Stoyanova I, Pirovski N, Lazarov N. *De novo* synthesis of galanin and neuropeptide Y seven and fourteen days after an axotomy of *n. massetericus*. XVIIIth National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with International Participation. Stara Zagora, June 1-3, 2007. *Trakia Journal of Sciences* **5, Suppl. 2**: 17–18.
2. **Dandov A**, Penkova Zh, Lazarov N. Substance P expression in the rat mesencephalic trigeminal nucleus after a peripheral neuronal injury. XIXth National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with International Participation. Pleven, May 29-31, 2009, Abstracts, p. 5.
3. **Dandov A**, Lazarov N. The MTN neurons and how they react to peripheral trauma (the morphological aspect). IVth Koprivshtitsa Morphological Days. Koprivshtitsa, June 4-6, 2010.
4. **Dandov A**, Lazarov N. Down-regulation of calcium-binding proteins in the rat mesencephalic trigeminal nucleus following a peripheral injury. XXth National Congress of the Bulgarian Anatomical Society and VIIIth International Symposium of Clinical Anatomy. Varna, September 30-October 1, 2011. *Scripta Scientifica Medica* **43**: 87.
5. **Dandov A**, Lazarov N. Neurochemical plasticity of rat mesencephalic trigeminal neurons following peripheral axonal injury. Jubilee symposium “50 years of the Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical University-Varna”. Varna, November 1-2, 2012.
6. **Dandov A**, Lazarov N. Morpho-neurochemical alterations in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after peripheral axonal injury. XXIst National Congress of the Bulgarian Anatomical Society. Sofia, May 31- June 2, 2013. Abstracts, pp. 75-76.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Драганов МН (2006). *Аферентни и еферентни проекции на мезенцефалното тригеминално ядро у плъх*. Дисертация за присъждане на научната и образователна степен “доктор”, Стара Загора.
2. Лазаров НЕ (1991) *Хистохимични и имуноцитохимични особености на първичния тригеминален аферентен неврон*. Дисертация за присъждане на научната степен “кандидат на медицинските науки”, Стара Загора.
3. Лазаров НЕ (2000) *Мезенцефално тригеминално ядро – ултраструктура, синаптична организация и неврохимична характеристика*. Дисертация за присъждане на научната степен “доктор на медицинските науки”, Стара Загора.
4. Aldskogius H, Arvidsson J (1978) Nerve cell degeneration in the trigeminal ganglion of the adult rat following peripheral nerve transection. *J Neurocytol* **7**: 229-250.
5. Aldskogius H, Arvidsson J, Grant G (1985) The reaction of primary sensory neurons to peripheral nerve injury with particular emphasis on transganglionic changes. *Brain Res Rev* **10**: 27-46.
6. Allen WF (1919) Application of the Marchi method to the study on the radix mesencephalica trigemini in the guinea pig. *J Comp Neurol* **30**: 169-216.
7. Alley KE (1974) Morphogenesis of the trigeminal mesencephalic nucleus in the hamster: cytogenesis and neurone death. *J Embryol Exp Morphol* **31**: 99-121.
8. Alvarado-Mallart MR, Batini C, Buisseret-Delmas C, Corvisier J (1975) Trigeminal representations of the masticatory and extraocular proprioceptors as revealed by horseradish peroxidase retrograde transport. *Exp Brain Res* **23**: 167-179.
9. Amano N, Yoshino K, Andoh S, Kawagishi S (1987) Representation of tooth pulp in the mesencephalic trigeminal nucleus and the trigeminal ganglion in the cat, as revealed by retrogradely transported horseradish peroxidase. *Neurosci Lett* **82**: 127-132.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

10. Appenteng K, O'Donovan MJ, Somjen G, Stephens JA, Taylor A (1978) The projection of jaw elevator muscle spindle afferents to fifth nerve motoneurons in the cat. *J Physiol (Lond)* **279**: 409-423.
11. Arvidsson J (1986) Transganglionic degeneration in vibrissae innervating primary sensory neurons of the rat: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* **249**: 392-403.
12. Arvidsson J, Rappaana P (1989) An HRP study of the central projections from primary sensory neurons innervating the rat masseter muscle. *Brain Res* **480**: 111-118.
13. Arvidsson J, Ygge J, Grant G (1986) Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res* **373**: 15-21.
14. Arvidsson J, Rappaana P, Diez M, Hökfelt T (1994) Expression of neuropeptides in the rat mesencephalic trigeminal nucleus after peripheral axotomy. *Neuroreport* **5**: 1269-1272.
15. Bae YC, Nakagawa S, Yasuda K, Yabuta N, Yoshida A, Pil PK, Moritani M, Chen K, Nagase Y, Takemura M, Shigenaga Y (1996) Electron microscopic observation of synaptic connections of jaw-muscle spindle and periodontal afferent terminals in the trigeminal motor and supratrigeminal nuclei in the cat. *J Comp Neurol* **374**: 421-435.
16. Bae YC, Park KP, Yoshida A, Nakagawa S, Kurata S, Chen K, Takemura M, Shigenaga Y (1997) Identification of γ -aminobutyric acid immunoreactive axon endings associated with mesencephalic periodontal afferent terminals and morphometry of the two types of terminals in the cat supratrigeminal nucleus. *J Comp Neurol* **389**: 127-138.
17. Baimbridge KG, Miller JJ, Parkes CO (1982) Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res* **239**: 519-25.
18. Blaustein MP (1988) Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci* **11**: 438-443.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

19. Bortolami R, Filogamo G (1964) Sur le noyau de la racine mésécephalique du trijumeau chez *Lepus cuniculus* (L.). Recherches expérimentales. C R Ass Anat **49**: 304-306.
20. Bortolami R, Veggetti A, Ciampoli A (1969) Electron microscopic observations on the mesencephalic trigeminal nucleus of the duck. J Submicr Cytol **1**: 235-245.
21. Brodal A (1981) Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, New York.
22. Brown MC, Butler RG (1976) Regeneration of afferent and efferent fibers to muscle spindles after nerve injury in adult cats. J Physiol (Lond) **260**: 253-266.
23. Bruska M, Wozniak W (1992) Early development of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in human embryos (stages 14 and 15). Folia Morphol (Warsz) **51**: 31-42.
24. Byers MR (1985) Sensory innervation of periodontal ligament of rat molars consists of unencapsulated Ruffini-like mechanoreceptors and free nerve endings. J Comp Neurol **231**: 500-518.
25. Byers MR, Dong WK (1989) Comparison of trigeminal receptor location and structure in the periodontal ligament of different types of teeth from the rat, cat, and monkey. J Comp Neurol **279**: 117-127.
26. Byers MR, Holland GR (1977) Trigeminal nerve endings in gingiva, junctional epithelium and periodontal ligament of rat molars, as demonstrated by autoradiography. Anat Rec **188**: 509-523.
27. Byers MR, Matthews B (1981) Autoradiographic demonstrations of ipsilateral and contralateral sensory nerve endings in cat dentin, pulp and periodontium. Anat Rec **201**: 249-260.
28. Byers MR, O'Connor TA, Martin RF, Dong WK (1986) Mesencephalic trigeminal sensory neurons of cat: axon pathways and structure of mechanoreceptive endings in periodontal ligament. J Comp Neurol **250**: 181-191.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

29. Capra NF, Anderson KV, Atkinson RC (1985) Localization and morphometric analysis of masticatory muscle afferent neurons in the nucleus of the mesencephalic root of the trigeminal nerve in the cat. *Acta Anat (Basel)* **122**:115-125.
30. Carlsson A (1987) Monoamines of the central nervous system: a historical perspective. In: Meltzer HY (Ed.) *Psychopharmacology: the Third Generation of Progress*. Raven Press, New York, pp. 39-48.
31. Castro-Lopez JM, Coimbra A, Grant G, Arvidsson J (1990) Ultrastructural changes of the central scalloped (C1) primary afferent endings of synaptic glomeruli in the substantia gelatinosa Rolandi of the rat after peripheral neurotomy. *J Neurocytol* **19**: 329-337.
32. Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**: 375-475.
33. Chandler SH (1989) Evidence for excitatory amino acid transmission between mesencephalic nucleus of V afferents and jaw-closer motoneurons in the guinea pig. *Brain Res* **477**: 252-264.
34. Clark SL (1926) Nissl granules of primary afferent neurones. *J Comp Neurol* **41**: 423-451.
35. Cody FW, Lee RW, Taylor A (1972) A functional analysis of the components of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the cat. *J Physiol* **226**: 249-261.
36. Copray JCVM, Liem RSB (1993) Survival and neurite formation of mesencephalic trigeminal neurones of the rat *in vitro*. *Arch Oral Biol* **38**: 547-557.
37. Copray JCVM, Liem RSB, Ter Horst GJ, van Willigen JD (1990a) Dopaminergic afferents to the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscope immunocytochemistry study. *Brain Res* **514**: 343–348.
38. Copray JCVM, Ter Horst GJ, Liem RSB, van Willigen JD (1990b) Neurotransmitters and neuropeptides within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **37**: 399–411.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

39. Copray JCVM, Liem RSB, van Willigen JD (1990c) Morphological arrangement between astrocytes and trigeminal mesencephalic primary afferent neurons in the rat. *Exp Brain Res* **83**: 215–218.
40. Copray JCVM, Liem RSB, Ter Horst GJ, van Willigen JD (1991) Origin, distribution and morphology of serotonergic afferents to the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett* **121**: 97-101.
41. Corbin KB (1940) Probst's tract in the cat. *J Comp Neurol* **77**: 455-467.
42. Corbin KB, Harrison F (1940) Function of the mesencephalic root of fifth cranial nerve. *J Neurophysiol* **3**: 423-435.
43. Costa M, Furness JB, Gibbins IL (1986) Chemical coding of enteric neurons. *Prog Brain Res* **68**: 217-239.
44. Dandov A, Draganov M, Lazarov N (2005) Synthesis of galanin and neuropeptide Y in the rat mesencephalic trigeminal nucleus after injury of n. massetericus. *Trakia J Sci* **3**: 1-5.
45. Dandov A, Penkova Zh, Lazarov N (2010) *De novo* expression of neuropeptides in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after masseteric nerve injury. *Acta Morphol Antropol* **15**: 27–30.
46. Dandov AD, Atanasova DY, Lazarov NE (2016) Morphological changes in the rat mesencephalic trigeminal nucleus following peripheral axotomy. *C R Acad Bulg Sci*, in press.
47. Darian-Smith I (1973) The trigeminal system. In: Iggo A (Ed.) *Handbook of Sensory Physiology, Somatosensory System*, Springer, Berlin, pp. 271–314.
48. Dault SH, Smith RD (1969) A quantitative study of the nucleus of the mesencephalic tract of the trigeminal nerve of the cat. *Anat Rec* **165**: 79-87.
49. Davies AM (1988) The trigeminal system: an advantageous experimental model for studying neuronal development. *Development* **103**: 175-183.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

50. Davies AM, Lumsden A (1990) Ontogeny of the somatosensory system: origins and early development of primary sensory neurons. *Annu Rev Neurosci* **13**: 61-73.
51. De Gandarias JM, Mendez PL, Vegas L, Echevarría E, Maza JL, Casis L (1999) Infraorbital nerve transection increases NADPH-diaphorase activity in the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *J Hirnforsch* **39**: 567-571.
52. De Montigny C, Lund JP (1980) A microiontophoretic study of the action of kainic acid and putative neurotransmitters in the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *Neuroscience* **5**: 1621-1628.
53. Del Negro CA, Chandler SH (1997) Physiological and theoretical analysis of K⁺ currents controlling discharge in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol* **77**: 537-553.
54. Dessem D, Taylor A (1989) Morphology of jaw-muscle spindle afferents in the rat. *J Comp Neurol* **282**: 389-403.
55. Dubner R, Sessle B, Storey A (1978) *The Neural Basis of Oral and Facial Function*. Plenum Press, London, pp. 1–56.
56. Duval M (1879) Recherches sur l'origine réelle des nerfs crâniens. *J Anat Phys* **15**: 492.
57. Elcock C, Boissonade FM, Robinson PP (2001) Changes in neuropeptide expression in the trigeminal ganglion following inferior alveolar nerve section in the ferret. *Neuroscience* **102**: 655-667.
58. Fernández-Fernández E, Paz-Doel R, Martínez-Rodríguez R (1990) Light microscope study of the enzyme activities of aspartate aminotransferase, GABA-transaminase and acetylcholinesterase in the mesencephalic trigeminal nucleus neural complex of *Mauremys caspica*. *Cell Mol Biol* **36**: 181-186.
59. Fillenz M (1955) Responses in the brainstem of the cat to stretch of extrinsic ocular muscles. *J Physiol (Lond)* **128**: 182-199.

60. Freeman W (1925) The relationship of the radix mesencephalica trigemini to the extraocular muscles. *Arch Neurol Psychiatry* **14**: 111-113.
61. Fujise T, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Fukagawa K, Nakata M, Sakata T (1993) Food consistency modulates eating volume and speed through brain histamine in rat. *Brain Res Bull* **32**: 555-559.
62. Ginestal E, Matute C (1993) Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry* **99**: 49-55.
63. Gonzalo-Sanz LM, Insausti R (1980) Fibers of mesencephalic trigeminal neurons in the maxillary nerve of the rat. *Neurosci Lett* **16**: 137-141.
64. Gottlieb S, Taylor A, Bosley MA (1984) The distribution of afferent neurons in the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the cat. *J Comp Neurol* **228**: 273-283.
65. Grant G, Ekvall L, Westman J (1970) Transganglionic degeneration in the vestibular nerve. In: Stahle J (Ed.) *Vestibular Function on Earth and in Space*. Pergamon Press, Oxford, pp. 301-305.
66. Harrison F, Corbin KB (1942) The central pathway for the jaw-jerk. *Am J Physiol* **135**: 439-445.
67. Held H (1893) Beiträge zur feineren Anatomie des Kleinhirns und des Hirnstammes. *Arch Anat Entw* **50**: 435-441.
68. Hiler DJ, Bhattacharjee A, Yamazaki S, Tei H, Geusz ME (2008) Circadian mPer1 gene expression in mesencephalic trigeminal nucleus cultures. *Brain Res* **1214**: 84-93.
69. Hinrichsen CFL, Larramendi LMH (1968) Synapses and cluster formation of the mouse mesencephalic fifth nucleus. *Brain Res* **7**: 296-299.
70. Hinrichsen CFL, Larramendi LMH (1969) Features of trigeminal mesencephalic nucleus structure and organization. I. Light microscopy. *Am J Anat* **126**: 497-506.
71. Hinrichsen CFL, Larramendi LMH (1970) The trigeminal mesencephalic nucleus. II. Electron microscopy. *Am J Anat* **127**: 303-320.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

72. Hökfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* **17**: 22-30.
73. Honda CN (1995) Differential distribution of calbindin-D28k and parvalbumin in somatic and visceral sensory neurons. *Neuroscience* **68**: 883-892.
74. Horinouchi R (1959) Histochemical studies of phosphatases in the brain. I. Histochemical distribution of acid and alkaline phosphatase, adenosine triphosphatase, 5-nucleotidase and glucose-6-phosphatase in the brain of normal rodents. *Med J Osaka Univ* **11**: 163-176.
75. Hsu SM, Raine L, Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**: 577-580.
76. Hugelin A, Bonvallet M (1957) Etude oscillographique d'un réflex monosynaptique crânien (réflexe massétérin). *J Physiol (Paris)* **49**: 210-211.
77. Huguenin G (1879) *Anatomie des Centres Nerveaux*. Paris (Quoted from Duval, Van Gehuchten, Teterjanz).
78. Ichikawa H, Sugimoto T (1999) Peptide 19-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res* **846**: 274-279.
79. Ichikawa H, Itota T, Torii Y, Inoue K, Sugimoto T (1999) Osteocalcin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat spinal and trigeminal nervous systems. *Brain Res* **838**: 205-209.
80. Ichikawa H, Itota T, Nishitani Y, Torii Y, Inoue K, Sugimoto T (2000) Osteopontin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat spinal and trigeminal nervous systems. *Brain Res* **863**: 276-281.
81. Ichikawa H, Jin HW, Terayama S, Yamaai T, Matsuo S, Sugimoto T (2007) The reduction of proprioceptors in the mesencephalic trigeminal tract nucleus after neonatal masseteric nerve transection; effect of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* **1153**: 98-102.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

82. Imamoto K (1972) Electron microscopic observations in the trigeminal mesencephalic nucleus following neurotomy of the third division of the trigeminal nerve. Arch Histol Jpn **34**: 361-374.
83. Imamoto K, Shimizu N (1970) Fine structure of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in the rat. Arch Histol Jpn **32**: 51-67.
84. Inagaki N, Yamatodani A, Shinoda K, Shiotani Y, Tohyama M, Watanabe T, Wada H (1987) The histaminergic innervation of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in rat brain: a light and electron microscopical study. Brain Res **418**: 388-391.
85. Jacobs JS, Miller MW (1999) Expression of nerve growth factor, p75, and the high affinity neurotrophin receptors in the adult rat trigeminal system: evidence for multiple trophic support systems. J Neurocytol **28**: 571-595.
86. Jacquin MF, Rhoades RW, Enfiejian HL, Egger MD (1983) Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study. J Comp Neurol **218**: 239-256.
87. Jerge CR (1963) Organization and function of the trigeminal mesencephalic nucleus. J Neurophysiol **26**: 379-392.
88. Johnston JB (1909) The radix mesencephalica trigemini. J Comp Neurol **19**: 593-644.
89. Kidikoro Y, Kubota K, Shuto S, Sumino R (1968) Reflex organization of cat masticatory muscles. J Neurophysiol **31**: 695-708.
90. Kölliker A (1896) *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*. 6 Aufl., Bd. 2 Leipzig.
91. Kolta A, Lund JP, Rossignol S (1990) Modulation of activity of spindle afferents recorded in trigeminal mesencephalic nucleus of rabbit during fictive mastication. J Neurophysiol **64**: 1067-1076.
92. Kolta A, Dubuc R, Campistron G, Lund JP (1991a) Investigations of possible neurotransmitters responsible for the inhibition of trigeminal primary afferents. IBRO Abstr **3**: 86.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

93. Kolta A, Dubuc R, Reader TA, Lund JP (1991b) Serotonergic and GABAergic innervation of the trigeminal mesencephalic and motor nuclei. *Can J Physiol Pharmacol* **69**: AXIV.
94. Kolta A, Dubuc R, Lund JP (1993) An immunocytochemical and autoradiographic investigation of the serotonergic innervation of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in the rabbit. *Neuroscience* **53**: 1113-1126.
95. Kosaka KZ (1912) Zur Frage der physiologischen Natur der zerebrallen Trigeminiwurzel. *Folia Neurobiol* **6**: 1-16.
96. Kruger L, Young RF (1981) Specialised features of the trigeminal nerve and its central connections. In: Samii M, Janeta PJ (Eds.) *The Cranial Nerves*. Springer, Berlin, pp. 273-301.
97. Kummer W (1994) Sensory ganglia as a target of autonomic and sensory nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroscience* **59**: 739-754.
98. Larsen JO, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J (1997) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after transection of the masseteric nerve. *Mol Brain Res* **46**: 109-117.
99. Lazarov N (1994a) Primary trigeminal afferent neuron of the cat: I. Studies on membrane-bound enzyme histochemistry. *J Brain Res* **35**: 355-371.
100. Lazarov N (1994b) Primary trigeminal afferent neuron of the cat: II. Neuropeptide- and serotonin-like immunoreactivity. *J Brain Res* **35**: 373-389.
101. Lazarov N (1995) Distribution and morphology of synaptic contacts in the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat: a quantitative ultrastructural study. *Ann Anat* **111** (Suppl.): 197-198.
102. Lazarov NE (1996) Fine structure and synaptic organization of the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat: a quantitative electron microscopic study. *Eur J Morphol* **34**: 95-106.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

103. Lazarov NE (2000) The mesencephalic trigeminal nucleus in the cat., Adv Anat Embryol Cell Biol **153**: 1-103.
104. Lazarov NE (2002) Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. Prog Neurobiol **66**: 19-59.
105. Lazarov NE (2007) Neurobiology of orofacial proprioception. Brain Res Rev **56**: 362-383.
106. Lazarov NE, Chouchkov CN (1995) Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase and γ -aminobutyric acid in the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat: a light and electron microscopic study. Anat Rec **242**: 123-131.
107. Lazarov NE, Chouchkov CN (1997) Neurochemistry of the cat mesencephalic trigeminal nucleus. Biomed Rev **8**: 1-20.
108. Lazarov N, Dandov A (1998) Distribution of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the cat. A histochemical and immunohistochemical study. Acta Anat **163**: 191-200.
109. Lazarov N, Dandov A (2000) Ultrastructural patterns of glutamate and GABA immunolabelling in the cat mesencephalic trigeminal nucleus. C R Acad Bulg Sci **53**: 109-112.
110. Lazarov NE, Dandov A, Stoyanova I, Chouchkov CN (1998) Calcium-binding proteins in the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat. Arch Physiol Biochem **106**: 370-377.
111. Lazarov N, Dandov A, Stoyanova I, Chouchkov C (1999) Axotomy-induced alterations in the neurochemical content of cat mesencephalic trigeminal nucleus neurons. It J Anat Embryol [Suppl] **104**: 386.
112. Lazarov NE, Gratzl M (2006) Selective expression of histamine receptors in rat mesencephalic trigeminal neurons Neurosci Lett **404**: 67-71.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

113. Lepousez G, Nissant A, Lledo PM (2015) Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. *Neuron* **86**: 387-401.
114. Liem RSB, Copray JCVM (1996) Immunogold localization of serotonin within synaptic terminals in the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *Acta Anat* **155**: 50-56.
115. Liem RSB, Copray JCVM, van Willigen JD (1991) Ultrastructure of the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *Acta Anat* **140**: 112-119.
116. Liem, RSB, Copray JCVM, van Willigen JD (1992) Distribution of synaptic boutons in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat—a quantitative electron-microscopical study. *Acta Anat* **143**: 74-78.
117. Liem RSB, Copray JCVM, van Willigen JD (1993) Serotonin-immunoreactive terminals in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: an electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Anat* **148**: 34-41.
118. Liem RSB, Copray JCVM, Van der Want JJL (1997) Dopamine-immunoreactivity in the rat mesencephalic trigeminal nucleus: an ultrastructural analysis. *Brain Res* **755**: 319-325.
119. Linden RWA (1978) Properties of intraoral mechanoreceptors represented in the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the cat. *J Physiol* **279**: 395-408.
120. Linden RWA, Millar BJ, Halata Z (1994) A comparative physiological and morphological study of periodontal ligament mechanoreceptors represented in the trigeminal ganglion and the mesencephalic nucleus of the cat. *Anat Embryol* **190**: 127-135.
121. Lipton SA, Kater SB (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* **12**: 265-270.
122. Lucchi ML, Bortolami R, Callegari E (1972) Ultrastructural features of mesencephalic trigeminal nucleus cells in cat, rabbit and pig. *J Submicrosc Cytol* **4**: 7-18.

123. Luo PF, Li JS (1991) Monosynaptic connections between neurons of trigeminal mesencephalic nucleus and jaw-closing motoneurons in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labelling study. *Brain Res* **559**: 267-275.
124. Luo PF, Wang BR, Peng ZZ, Li JS (1991) Morphological characteristics and terminating patterns of masseteric neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labeling study. *J Comp Neurol* **303**: 286-299.
125. Maeda T (1966) Experimental and histochemical studies on the hyperchromic neurons. *Acta Histol Japan* **27**: 177-197.
126. Maier A (1979) Occurrence and distribution of muscle spindles in masticatory and suprahyoid muscles of the rat. *Am J Anat* **155**: 483-506.
127. Manni E, Lucchi ML, Filippi GM, Bortolami R (1982) Area postrema and the mesencephalic trigeminal nucleus. *Exp Neurol* **77**: 39-55.
128. Marani E, Usunoff KG (1998) The trigeminal motonucleus in man. *Arch Physiol Biochem* **106**: 346-354.
129. Marchi V (1886) Sulle degenerazioni consecutive all' estirpazione totale e parziale del cervelletto. *Riv Sper Freniat* **12**: 50-56.
130. Matesz C (1981) Peripheral and central distribution of fibers of the mesencephalic trigeminal root in the rat. *Neurosci Lett* **27**: 13-17.
131. Matesz C (1994) Synaptic relations of the trigeminal motoneurons in a frog (*Rana esculenta*). *Eur J Morphol* **32**: 117-121.
132. May O, Horsley V (1910) The mesencephalic root of the fifth nerve. *Brain* **33**: 175-203.
133. Medici T, Shortland PJ (2015) Effects of peripheral nerve injury on parvalbumin expression in adult rat dorsal root ganglion neurons. *BMC Neurosci* **16**: 93.
134. Merkel Fr (1874) Die trophische Wurzel des Trigemini. *Unters ad Anat Inst zu Rostock* (Reviewed in *Jahresb über d Leist in d ges Med* **1**:68).

135. Mineff EM, Popratiloff A, Usunoff KG, Marani E (1998) Immunocytochemical localization of the AMPA receptor subunits in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Arch Physiol Biochem* **106**: 203-209.
136. Mizuno N, Yasui Y, Nomura S, Itoh K, Konishi A, Takada M, Kudo M (1983) A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol* **215**: 290-298.
137. Nagy JI, Buss M, Daddona PE (1986) On the innervation of trigeminal mesencephalic primary afferent neurons by adenosine deaminase-containing projections from the hypothalamus in the rat. *Neuroscience* **17**: 141-156.
138. Nakajima Y (1965) Histochemical studies on carbohydrate metabolism in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in the rat. *Bull Tokyo Med Dent Univ* **12**: 265-282.
139. Nakamura Y, Goldberg LJ, Clemente CD (1967) Nature of the masseteric monosynaptic reflex induced by stimulation of the orbital gyrus of the cat. *Brain Res* **6**: 184-198.
140. Narayanan CH, Narayanan Y (1978) Determination of the embryonic origin of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in birds. *J Embryol Exp Morphol* **43**: 85-105.
141. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* **82**: 163-201.
142. Nielsch U, Keen P (1989) Reciprocal regulation of tachykinin- and vasoactive intestinal peptide-gene expression in rat sensory neurones following cut and crush injury. *Brain Res* **481**: 25-30.
143. Noguchi K, De León M, Nahin RL, Senba E, Ruda MA (1993) Quantification of axotomy-induced alteration of neuropeptide mRNAs in dorsal root ganglion neurons with special reference to neuropeptide Y mRNA and the effects of neonatal capsaicin treatment. *J Neurosci Res* **35**: 54-66.

144. Nomura S, Mizuno N (1985) Differential distribution of cell bodies and central axons of mesencephalic trigeminal nucleus neurons supplying the jaw-closing muscles and periodontal tissue: a transganglionic tracer study in the cat. *Brain Res* **359**: 311-319.
145. Nomura S, Konishi A, Itoh K, Sugimoto T, Yasui Y, Mitani A, Mizuno N (1985) Multipolar neurons and axodendritic synapses in the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat. *Neurosci Lett* **55**: 337-342.
146. Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y (1985) Trigeminal mesencephalic neurons innervating functionally identified muscle spindles and involved in the monosynaptic stretch reflex of the lateral pterygoid muscle of the guinea pig. *J Comp Neurol* **236**: 106-120.
147. Ohara H, Tachibana Y, Fujio T, Takeda-Ikeda R, Sato F, Oka A, Kato T, Ikenoue E, Yamashiro T, Yoshida A (2016) Direct projection from the lateral habenula to the trigeminal mesencephalic nucleus in rats. *Brain Res.* **1630**: 183-197.
148. Pearson AA (1949a) The development and connections of the mesencephalic root of the trigeminal nerve in man. *J Comp Neurol* **90**: 1-46.
149. Pearson AA (1949b) Further observations on the mesencephalic root of the trigeminal nerve. *J Comp Neurol* **91**: 147-194.
150. Pfaffmann C (1939) Afferent impulses from the teeth due to pressure and noxious stimulation. *J Physiol (Lond)* **97**: 207-219.
151. Pfaller K, Arvidsson J (1988) Central distribution of trigeminal and upper cervical primary afferents in the rat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin. *J Comp Neurol* **268**: 91-108.
152. Piatt J (1945) Origin of the mesencephalic V root cells in *Amblystoma*. *J Comp Neurol* **82**: 35-53.
153. Raappana P, Arvidsson J (1992) The reaction of mesencephalic trigeminal neurons to peripheral nerve transection in the adult rat. *Exp Brain Res* **90**: 567-571.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомиа

154. Ramon y Cajal S (1896) *Beitrag zum Studium der Medulla Oblongata, des Kleinhirns und des Ursprungs der Gehirnnerven*. Johann Ambrosius Barh, Leipzig.
155. Ramon y Cajal S (1909) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertèbrés*, vol. 1 A. Maloine, Paris.
156. Roberts BL, Witkovsky P (1975) A functional analysis of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the Selachian brain. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **190**: 473-495.
157. Rokx JT, Jüch PJ, van Willigen JD (1986) Arrangement and connections of mesencephalic trigeminal neurons in the rat. *Acta Anat (Basel)* **127**: 7-15.
158. Sasaki Y, Wakisaka S, Kurisu K (1994) Effects of peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve on the levels of neuropeptide Y in rat trigeminal primary afferent neurons. *Brain Res* **664**: 108-114.
159. Scharf JH (1958) Sensible Ganglien. In: Möllendorff MV, Bargmann W (Eds.), *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. IV/3, Nervensystem. Springer, Berlin, pp. 14-15, 290-300.
160. Schmalbruch H (1987) Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. *Anat Rec* **219**: 323-329.
161. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG. (1983) Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* **9**: 229-234.
162. Schneider AJ (1928) The histology of the radix mesencephalica n. trigemini in the dog. *Anat Rec* **38**: 321-339.
163. Scott DA, Dinowitz S, Terhaar K, Sherlock D, Campbell MA, Levine D (1994) Cytochemical characteristics of neurons in the trigeminal mesencephalic nucleus of hatching chicks. *J Comp Neurol* **350**: 302-310.
164. Shammah-Lagnado SJ, Costa MS, Ricardo JA (1992) Afferent connections of the parvocellular reticular formation: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* **50**: 403-425.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

165. Sheinin JJ (1930) Typing of the cells of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in the dog, based on Nissl-granule arrangement. *J Comp Neurol* **50**: 109-131.
166. Sheinin JJ (1933) Studies of the mesencephalic nucleus in the normal and experimental cat. *Anat Rec* **55**: 36.
167. Sherrington CS (1917) Reflexes elicitable in the cat from pinna, vibrissae and jaws. *J Physiol (Lond)* **51**: 404-431.
168. Shigenaga Y, Yoshida A, Mitsuhiro Y, Tsuru K, Doe K (1988a) Morphological and functional properties of trigeminal nucleus oralis neurons projecting to the trigeminal motor nucleus of the cat. *Brain Res* **461**: 143-149.
169. Shigenaga Y, Sera M, Nishimori T, Suemune S, Nishimura M, Yoshida A, Tsuru K (1988b) The central projections of masticatory afferent fibers to the trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord. *J Comp Neurol* **268**: 489-507.
170. Shigenaga Y, Yoshida A, Mitsuhiro Y, Doe K, Suemune S (1988c) Morphology of single mesencephalic trigeminal neurons innervating periodontal ligament of the cat. *Brain Res* **448**: 331-338.
171. Shigenaga Y, Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Cao CQ (1988d) Physiological and morphological characteristics of cat masticatory motoneurons-intracellular injection of HRP. *Brain Res* **461**: 238-256.
172. Sivanandasingham P, Warwick R (1976) A comparative numerical study of the trigeminal mesencephalic nucleus. *Acta Anat (Basel)* **96**: 449-458.
173. Stainier DYR, Gilbert W (1990) Pioneer neurons in the mouse trigeminal sensory system. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 923-927.
174. Stainier DY, Gilbert W (1991) Neuronal differentiation and maturation in the mouse trigeminal sensory system, in vivo and in vitro. *J Comp Neurol* **311**: 300-312.
175. Stoyanova II, Lazarov NE (2005a) Localization of nitric oxide synthase in rat trigeminal primary afferent neurons using NADPH-diaphorase histochemistry. *J Mol Histol* **36**: 187-193.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

176. Stoyanova II, Lazarov NE (2005b) Localization of orexin-A-immunoreactive fibers in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Brain Res* **1054**: 82-87.
177. Sturrock RR (1987) Changes in the number of neurons in the mesencephalic and motor nuclei of the trigeminal nerve in the ageing mouse brain. *J Anat* **151**: 15-25.
178. Szentágothai J (1948) Anatomical considerations of monosynaptic reflex arc. *J Neurophysiol* **11**: 445-454.
179. Tarkhan AA (1934) The innervation of extrinsic ocular muscles. *J Anat* **68**: 293-313.
180. Tashiro T, Satoda T, Matsushima R, Mizuno N (1989) Enkephalin-, substance P- and serotonin-like immunoreactive axonal varicosities in close apposition to perikarya of mesencephalic trigeminal nucleus neurons in the cat. *Brain Res* **494**: 162-167.
181. Ter Horst GJ, Copray JCVM, Liem RSB, van Willigen JD (1991) Projections from the rostral parvocellular reticular formation to pontine and medullary nuclei in the rat: involvement in autonomic regulation and orofacial motor control. *Neuroscience* **40**: 735-758.
182. Umehara H, Mizuguchi H, Fukui H (2012) Identification of a histaminergic circuit in the caudal hypothalamus: an evidence for functional heterogeneity of histaminergic neurons. *Neurochem Int* **61**: 942-947.
183. Umemoto S, Noguchi K, Kawai Y, Senba E (1994) The expression of neuropeptides and their mRNAs in the trigeminal mesencephalic nucleus following masseteric nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res* **23**: 93-99.
184. Usunoff KG, Marani E, Schoen JH (1997) The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **136**: 1-126.
185. Varathan V, Shigenaga Y, Takemura M (2001) Nitric oxide synthase/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the brainstem trigeminal nuclei after transection of the masseteric nerve in rats. *J Neurosci Res* **66**: 428-438.
186. Vázquez J, Muñoz M, García JC (1998) Modifications in the distribution of met-enkephalin in the pons of the cat, following the intravenous administration of

- clonidine: an immunocytochemical experimental study. *Histol Histopathol* **13**: 619-626.
187. Wakisaka S, Takikita S, Youn SH, Kurisu K (1996a) Partial coexistence of neuropeptide Y and calbindin D28k in the trigeminal ganglion following peripheral nerve axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat. *Brain Res* **707**: 228-234.
188. Wakisaka S, Youn SH, Miyawaki Y, Kurisu K (1996b) The effects of peripheral nerve injury of the masseteric nerve on the levels of calcium binding proteins and neuropeptide Y, and their correlation in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Brain Res* **735**: 249-256.
189. Walberg F (1984) On the morphology of the mesencephalic trigeminal cells. New data based on tracer studies. *Brain Res* **322**: 119-123.
190. Walberg F, Dietrichs E, Nordby T (1984) The medullary projection from the mesencephalic trigeminal nucleus. An experimental study with comments on the intrinsic trigeminal connections. *Exp Brain Res* **56**: 377-383.
191. Wallenberg A (1904) Neue Untersuchungen über der Hirnstamm der Taube. III. Die cerebrale Trigeminuswurzel. *Anat Anz* **25**: 526-528.
192. Weihe E (1990) Neuropeptides in primary sensory neurons. In: Zenker W, Neuhuber W (Eds.) *The Primary Afferent Neuron - A Survey of Recent Morpho-Functional Aspects*. Plenum Press, New York, pp. 127-159.
193. Weinberg E (1928) The mesencephalic root of the fifth nerve. A comparative anatomical study. *J Comp Neurol* **46**: 249-405.
194. Weston JA (1970) The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphogen* **8**: 41-114.
195. Weston JA, Girdlestone J, Ciment G (1984) Heterogeneity in neural crest cell populations. In: Black IB (Ed.) *Cellular and Molecular Biology of Neuronal Development*. Plenum Press, New York, pp. 51-62.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

196. Willems E (1911) Localisation motrice et kinésésique les noyaux masticateurs mésencéphalique du trijumeau chez le lapin. *Neuraxe* **12**: 1-229.
197. Witkovsky P, Roberts BL (1976) Electron microscopic observations of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the Selachian brain. *J Neurocytol* **5**: 643-660.
198. Yabuta NH, Yasuda K, Nagase Y, Yoshida A, Fukunishi Y, Shigenaga Y (1996) Light microscopic observations of the contacts made between two spindle afferent types and alpha-motoneurons in the cat trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol* **374**: 436-450.
199. Yamamoto T, Shiosaka S, Daddona PE, Nagy JI (1988) Further observations on the relationship between adenosine deaminase containing axons and trigeminal mesencephalic neurons: an electron microscopic, immunohistochemical and anterograde tracing study. *Neuroscience* **26**: 669-680.
200. Ygge J, Aldskogius H (1984) Intercostal nerve transection and its effect on the dorsal root ganglion: a quantitative study on ganglion cell numbers and sizes. *Exp Brain Res* **55**: 402-408.
201. Yokoyama S, Kinoshita K, Muroi Y, Ishii T (2013) The effects of bilateral lesions of the mesencephalic trigeminal sensory nucleus on nocturnal feeding and related behaviors in mice. *Life Sci* **93**: 681-686.
202. Yoshida S, Oka H (1998) Membrane properties of dissociated trigeminal mesencephalic neurons of the adult rat. *Neurosci Res* **30**: 227-234.
203. Yoshida A, Yasuda K, Dostrovsky JO, Bae YC, Takemura M, Shigenaga Y, Sessle BJ (1994) Two major types of premotoneurons in the feline trigeminal nucleus oralis as demonstrated by intracellular staining with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **347**: 495-514.
204. Yoshida A, Ichikawa H, Sugimoto T (1995) CGRP in peripherally axotomized mesencephalic trigeminal neurones of the rat. *Neuroreport* **6**: 837-840.

Морфологична и неврохимична пластичност на Me5 у плъх след периферна аксотомия

205. Yoshida A, Hiraga T, Moritani M, Chen K, Takatsuki Y, Hirose Y, Bae YC, Shigenaga Y (1998) Morphologic characteristics of physiologically defined neurons in the cat trigeminal nucleus principalis. *J Comp Neurol* **401**: 308-328.
206. Yoshino K, Andoh S, Kawagishi S, Yamauchi M, Jones TE, Amano N (1989) Innervation of the tooth pulp by the mesencephalic trigeminal nucleus in the cat: a retrograde horseradish peroxidase study. *Brain Res* **503**: 152-155.
207. Zhang JD, Yoshida A, Shigenaga Y (1997) Ultrastructural analysis of inputs around the soma of an intra-cellularly labeled masseter muscle spindle afferent in cat mesencephalic trigeminal nucleus. *J Brain Res* **38**: 495-502.

XIII. S U M M A R Y

The aim of this study was to investigate the structural and neurochemical plasticity of the neuronal population in the mesencephalic trigeminal nucleus (Me5) in the rat following a peripheral axotomy of the masseteric nerve. In addition to being a unique nucleus in the CNS, chiefly made up of pseudounipolar sensory neurons, Me5 is also a suitable paradigm for studying the plastic alterations in neurons in a chronological manner. While it has been known for a time that the Me5 neurons utilize classical neurotransmitters and amino-acids in norm, little information is available about the morphological and chemical events that take place in the nucleus after an injury. Therefore, we set it as a task to follow up the structural adaptive changes in axotomized Me5 neurons, validate NADPH-diaphorase activity in them, and using immunohistochemistry for glutamate, substance P (SP), calcitonin-gene related protein (CGRP), neuropeptide Y (NPY) and galanin (GAL), find out about the altered neurochemical phenotype of the injured neurons. Our results distinctly show that the Me5 neurons in the rat are extremely sensitive to peripheral injury and demonstrate clearly observed structural and neurochemical plasticity. The adaptive morphological alterations comprise of numerical and quality alterations in the axotomized Me5 population which are statistically significant when compared with the number and phenotype of the neurons on the contralateral intact side. Besides, the axotomy-induced alterations in the neurochemical character of Me5 are best signified by the down-regulation of the classical neurotransmitters in the nucleus in health, and the up-regulation of nitric oxide synthase and de novo synthesis of certain neuroactive substances such as NPY, SP, GAL and VIP. It can be inferred from our findings that the described phenomena only occur in the nucleus in cases of injury and changes in the environmental cues and serve as adaptive mechanisms and powerful trophic factors for the neuronal survival in Me5. There is undoubtedly still a long way to go in order to clarify the dynamic and plastic alterations occurring in the nerve system in health and disease, and also explain their role in such important functions as pain,

БЛАГОДАРНОСТИ

Този дисертационен труд стана реалност благодарение на подкрепата, съпричастността и помощта на много хора. Бих искал да изкажа дълбока благодарност на:

Моя научен ръководител и дългогодишен колега **проф д-р Николай Лазаров**, който непрестанно беше до мен и ми помагаше както в експерименталната част, така и в написването на работата.

Изказвам искрена благодарност на **проф. д-р Димка Хинова – Палова** за подкрепата и насърчителните думи и съвети.

Специално благодаря на **акад. д-р Владимир Овчаров** за полезните дискусии, незабравимите съвети и многото оригинални идеи.

Благодаря на **проф. д-р Адриан Палов** за интереса, който винаги е проявявал към работата ми, куража, който ми е давал и полезните напътствия.

Благодаря сърдечно на моя пръв учител по анатомия, **проф. д-р Христо Чучков**, който запали в мен интереса към клетъчната биология и невробиологията.

Специално благодаря на **д-р Димитринка Атанасова** за огромната ѝ помощ по техническото оформяне на този труд.

Благодаря на колегите си **доц. д-р Ирина Стоянова** и **д-р Александър Илиев**, с които прекарах години заедно в работата си и които бяха съпричастни към създаването на този труд.