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

Д-Р ТОДОР ВАЛЕНТИНОВ КИРОВ

МОРФОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА МИЕНТЕРИЧНИЯ СПЛИТ И НЕВРОХИМИЧНИ АСПЕКТИ НА НЕАДРЕНЕРГИЧНА И НЕХОЛИНЕРГИЧНА ТРАНСМИСИЯ В КОЛО-РЕКТАЛНАТА ОБЛАСТ НА ПЛЪХ

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН «ДОКТОР»

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЦИТОЛОГИЯ

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р ЛИНА МАЛИНОВА, ДМ

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ: ПРОФ. Д-Р НИКОЛАЙ ЛАЗАРОВ, ДМ, ДМН

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:

1. **АКАД. ПРОФ. Д-Р ВЛАДИМИР ОВЧАРОВ, ДМ, ДМН**
2. **ДОЦ. Д-Р ИРИНА СТОЯНОВА, ДМ**

СОФИЯ, 2022 Г.

Дисертантът е зачислен като докторант на самостоятелна подготовка към Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София.

Дисертационният труд е написан на 176 стандартни страници и е онагледен с 142 фигури (в това число 128 комбинирани фотомикрографии и 8 графики) и 12 таблици. В библиографския списък са включени 236 литературни източника, от които 2 на кирилица и 234 на латиница.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, състояло се на 11.07.2022 г.

Изследванията по дисертационния труд са извършени предимно в Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински факултет на Медицински университет – София, а част от тях – в лабораторията по „Функционална невроанатомия“ на Института по невробиология към Българската академия на науките.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 12.10.2022 г. от 13:00 ч. в Анатомична аудитория на Медицински университет – София, бул. „Пенчо Славейков“ №34, на открито заседание на научното жури.

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, ул. „Здраве“ №2 и на интернет страницата на Медицински университет – София.

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих желал да изразя огромната си благодарност към моя научен ръководител, **проф. д-р Лина Малинова**, за безценните напътствия, съвети и редакционна помощ, които съпътстваха целия процес на изготвяне на този дисертационен труд и направиха възможно неговото завършване.

Искрено благодаря и на своя научен консултант, **проф. д-р Николай Лазаров**, за неотлъчната помощ и в теоретичен, и в практически аспект, както и за споделения искрен стремеж към съвършенство в научната дейност, който се надявам дори в малка степен да е намерил отражение в мен.

Трудно е да поставя в думи благодарността си към **доц. Димитринка Атанасова**, която не просто оказа незаменима практическа помощ при изготвянето на този труд, но и от която с лекота мога да кажа, че съм възприел най-голямата част от уменията си в научната сфера.

Изразявам искрената си признателност и към моя първи учител по анатомия **проф. д-р Лазар Желев**, от когото през целия си академичен път съм взимал професионален пример и в чието лице винаги съм намирал помощ, когато е била нужна.

Огромна признателност отправям и към целия лабораторен екип на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология в лицето на **Събина Митова**, **Снежина Илиева и Галина Маринова**, които направиха възможна извършената експерименталната дейност.

Благодаря и на **цялото си семейство** за доверието, съпричастността и търпението, които бяха единствен стимул да продължавам напред през трудните моменти.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....5
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....9
1. Експериментални животни.....9
2. Вземане и подготовка на материала.....9
3. Конвенционални методи.....9
4. Ензимохистохимична методи.....11
5. Имунохистохимични методи.....11
6. Обработка и анализ на изображенията.....11
7. Сравнителен анализ.....12
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ.....13
1. Общи съображения.....13
2. Неспецифични оцветявания.....13
3. Хистохимична реакция за визуализиране на NADPH-диафораза.....21
4. Имунохистохимични реакции.....24
5. Сравнителен анализ на миентеричния сплит по хода на коло-ректалната област.....30
V. ОБСЪЖДАНЕ.....41
1. Морфологична организация на миентеричния сплит.....41
2. Неврохимичен профил на миентеричния сплит.....48
3. Специфични особености на нервните влакна, произлизащи от МС.....54
4. Регионални особености на NANC системата в КРО.....55
5. Бъдещи насоки и перспективи.....58
VI. ИЗВОДИ.....60
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....61
VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД…...62
IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....62
X. SUMMARY.....63
БЕЛЕЖКИ.....64

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ – аденозин трифосфат
ГИТ – гастроинтестинален тракт
ЕНС – ентерална нервна система
КРО – коло-ректална област
ЦНС – централна нервна система
МГ – миентерични ганглии
МС – миентеричен сплит
ЦМП – циркулярен мускулен подслой
НМП – надлъжен мускулен подслой
ХЕ – хематоксилин и еозин
ChAT – холин ацетилтрансфераза
DAB – 3,3'-диаминобензидин
NADP$^+$ – никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат
NADPH – редуцирана форма на NADP$^+$
NADPH-d – NADPH-диафораза
NANC – неадренергична, нехолинергична
nNOS – невронална изоформа на азотен оксид синтаза
NO – азотен оксид
SP – субстанция Р

I. ВЪВЕДЕНИЕ

От края на деветнадесети век е известно, че в стената на органите на гастроинтестиналния тракт (ГИТ) има голямо струпване на нервна тъкан, определено с течение на времето като ентерална нервна система (ЕНС). Първите по-съществени описания на ЕНС датират отпреди около 150 години и са дело на немските лекари-изследователи Meissner (1857), Billroth (1858) и Auerbach (1862). С оглед на изпълняваните от ЕНС функции, може да се генерализира, че тя осъществява инервацията на гладката чревна мускулатура, контролира дейността на лигавичния секреторен епител и кръвоносните съдове на ГИТ, както и на билиарната система и панкреаса. Невроналните тела се групират в малки клетъчни струпвания, наречени ентерални ганглии, които от своя страна са свързани един с друг чрез снопове нервни влакна, т.нар. интерганглионерни връзки. По този начин се образуват приплеснати мрежовидни структури, наречени сплитове, сплетения или плексуси. В областта на червата, ЕНС е представена от два взаимно свързани сплита, класически определени като субмукозен, известен още като плексус на Meissner, и миентеричен (познат също като плескус на Auerbach).

Миентеричният сплит (МС) е мрежа от малки миентерични ганглии (МГ) и свързващите ги интерганглионерни връзки, разположена между циркулярния мускулен подслой (ЦМП) и надлъжния мускулен подслой (НМП). Той се открива по цялата околовръстна обиколка на червата и по цялата дължина на отделните сегменти на ГИТ, като започва от горната част на хранопровода и се простира по хода на цялата коло-ректална област (КРО).

Първата, най-утвърдена и валидна и до наши дни, морфологична класификация на ентералните неврони е тази на Dogiel (1899). Той описва морфологията на миентеричния и субмкозния сплит на червата предимно на морско свинче, което впоследствие се запазва като основен модел за изследвания. Според Dogiel има три типа неврони, приели през годините неговото име – неврони тип *Dogiel* 1, 2 и 3. По-късно част от невроните са преразпределени в четири нови групи. Тези неврони формират четири функционално обособени групи: мотоневрони, интерневрони, собствени първични аферентни неврони и интестинофугални неврони, като всеки от тях има и подгрупи.

На фона на относително ранното утвърждаване на ацетилхолина като основен възбуден трансмитер на ЕНС, не е доказано адренергичната трансмисия да има функционално значение в нея (Burnstock и съавт. 1966). По тази причина, с времето е прието, че в ЕНС съществуват две основни трансмитерни системи: холинергична и неадренергична, нехолиенргична или NANC (англ.: Non-

Adrenergic, Non-Cholinergic) трансмисия. Последната включва в себе си широка гама от трансмитери, често класифицирани в три големи групи: пептиди (тахикинини, вазоактивен интестинален пептид и др.), пурини, напр. аденозин трифосфат (АТФ) и газове като азотен оксид (NO).

От направения литературен преглед се установи, че устройството на МС на ЕНС е изследвано при бозайници и някои гризачи, но липсват систематизирани морфологични и неврохимични изследвания при плъха. Освен това, направените дотук изследвания са основани на работа върху *wholemount* препарати, които са информативни, но и често трудно приложими в практиката. Проучванията в областта на неврохимичната принадлежност на миентералните неврони при плъха са все още недостатъчни, а сравнителни изследвания върху разликите в експресията на трансмитерите в отделните части на КРО почти липсват.

По тези причини, настоящият дисертационен труд представлява опит за комплексно характеризиране на морфологията на МС на тъканни срези, със специфичен акцент върху неврохимичните особености на NANC трансмисията в КРО на плъха.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е да се установи морфологичната организация на МС и неврохимичните особености на неадренергичната и нехолинергична трансмисия в коло-ректалната област на плъх.

За осъществяването на тази цел, ние си поставихме следните **задачи**:

1. С помощта на класически хистологични техники да установим нормалната морфология на МС в КРО на плъх.
2. Чрез използването на витални оцветители да определим цитоархитектониката на невроналните структури на МС.
3. Чрез ензимохистохимични методи да се докаже наличието на нитрергични неврони в МС.
4. Посредством светлинномикроскопски имунохистохимични реакции да се установи неврохимичната принадлежност на ентералните неврони към нитрергични, пептидергични и пуринергични субпопулации в МС.
5. Да се направи сравнителен статистически анализ на установените неврохимични находки по хода на КРО.
6. На основата на получените данни да се направи комплексен анализ на неврохимичния профил на миентералните неврони с акцент върху NANC трансмитерите, използвани от тях.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментални животни

Експериментите в настоящето изследване бяха осъществени върху материал от плъхове, порода Wistar. Изследвани бяха общо 20 възрастни плъха от мъжки и женски пол с телесно тегло 200 – 300 g. Всички животни бяха редовно наблюдавани да бъдат в добро здравословно състояние, да получават храна и вода *ad libitum* и бяха обезпаразитени от персонала на вивариума към Медицински университет – София. Спазени бяха международните принципи за работа с опитни животни (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC, National Academy Press, 1996), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите, определени от Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет – София (КЕНИМУС). Експерименталните изследвания бяха осъществени в лабораторията на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология на Медицински университет – София и в лабораторията по „Функционална невроанатомия“ на Института по невробиология към Българската академия на науките.

2. Вземане и подготовка на материала

Всички експериментални животни първоначално бяха повърхностно упоявани с диетилов етер, последвано от интраперитонеално инжектиране на тиопентал (40mg/kg телесна маса). След въвеждане в дълбока анестезия, те бяха перфузирани през възходящата аорта.

Дебелото черво на всички експериментални животни беше внимателно отпрепарирано от областта на сляпото черво до ануса, след което бяха ексцизирани късчета с дължина 1 cm от областта на проксималния и дисталния колон, ректума и аналния канал. Те бяха подложени на постфиксация, а впоследствие и на процедура по включване на материала в парафин.

Рязането на парафиновите блокчета беше извършено с помощта на парафинов микротом Leica RM 2125 RTF. Срезовете бяха с три възможни ориентации: напречни, надлъжни и тангенциални спрямо надлъжната ос на червото. Дебелина им беше 6 μm, като серийните срезове се улавяха на хром-желатинирани предметни стъкла.

3. Конвенционални методи

3.1. Оцветяване с хематоксилин и еозин (ХЕ)

За успешното прилагане на методиката беше необходимо предварително изготвяне на два оцветителни разтвори. За първият от тях разтворихме 1 g хематоксилин в 1 l дестилирана вода в топла среда. Към така получения разтвор

прибавихме 0.2 g натриев или калиев йодат до пълното им разтваряне в него, след което и 50 g калиево-алуминиева стипца, 50 g хлоралхидрат и 0.5 g лимонена киселина. За изготвянато на втория разтвор разтворихме 1 g еозин в 50 ml 70% спиртен разтвор.

Доведените до вода депарафинирани срезове бяха поставени в разтвор на хематоксилин за 7 min, след което базичните структури бяха диференцирани с хладка чешмяна вода за около 15-20 min. Предметните стъкла бяха прехвърлени в разтвора на еозин за 10 min, а диференцирането беше изпълнено чрез кратко потапяне на стъклата в две кювети с 96° и 100° алкохол.

3.2. Оцветяване по метода на *Nissl*

При този метод, депарафинираните и доведени до вода срезове се прехвърлят в 0.5% разтвор на крезилвиолет (*Cresyl violet, Merck*) за 8-10 min. Процедурата включваше още диференциране в оцетнокисел спирт и последователно поставяне на предметните стъкла в кювети с 96° и 100° алкохол.

3.3. Сребърна импрегнация по метода на *Gomori*

За тази методика, депарафинираните и доведени до вода предметни стъкла бяха подготвени чрез последователно поставяне в разтвор на калиев перманганат ($KMnO_4$) и в 1% разтвор на калиев метабисулфид ($K_2S_2O_5$), с цел спиране на първата реакция.

Същинската импрегнация започна с поставяне на предметните стъкла в 2% желязоамониева стипца. След това стъклата бяха прехвърлени в т.нар. амонячно сребро, състоящо се от 10% сребърен нитрат, 10% калиева основа и няколко капки амоняк. Последва поставяне на стъклата в 10% формалин до покафеняване на тъканта. Вирирането, възстановяването и стабилизирането на реакцията бяха извършени съответно чрез поставяне в 0.1% златен хлорид (AuCl), в 1-3% калиев метабисулфид ($K_2S_2O_5$) и в 1% натриев тиосулфат ($Na_2S_2O_3$).

3.4. Оцветяване с витален оцветител (толуидиново синьо)

Депарафинираните и доведени до вода срезове бяха прехвърлени в 0.1% разтвор на толуидиново синьо и 2.5% разтвор на Na-карбонат. След изплакване с дестилирана вода, оцветяването беше диференцирано в 70° етанол до отмиване на излишната боя, извършено под микроскопски визуален контрол.

3.5. Сребърна импрегнация по метода на *Golgi*

Методиката включваше използването на два последователни разтвора, във всеки от които материалът престоя общо 48 h. Първият се състоеше от 6% калиев бихромат, 6% хлоралхидрат и 4% кисел формалин в обем не по-малък от 30 пъти обема на тъканта. Преди третирането с втория разтвор материалът беше промит

за кратко с 0.75% разтвор на сребърен нитрат. Вторият разтвор представляваше 1 – 1.5% сребърен нитрат. Впоследствие бяха изготвени парафинови блокчета, а от тях – срезове с дебелина 30 μm. Преди включването им в ентелан, приложихме контраоцветяване с еозин.

4. Ензимохистохимични методи

С цел визуализирането на нитрергичните неврони, приложихме методиката на Scherer-Singler и съавт. (1983) за доказване на ензима NADPH-диафораза (NADPH-d). При нея субстратът е β-NADPH, а контролните срезове се инкубират в среда без субстрат.

Тъканният материал беше взет непосредствено след въвеждането на животните под наркоза. След това се пристъпи към изготвяне на криостатни срезове с дебелина 6-7 μm, при температура -25°C. Инкубацията извършихме в термостат при 37°C в продължение на 30 min. Инкубационна среда се състоеше от 10 mg нитро BT; 25 mg β-NADPH; 0.3% Triton X-100 (Merck), разтворен в 25 ml 0.1 M Tris/HCl буфер с pH 7.56.

5. Имунохистохимични методи

За провеждане на имунохистохимичните реакции ние прилагахме ABC (авидин-биотин пероксидазен комплекс) техниката, съгласно Hsu и съавт. (1981). Инкубациите бяха извършени във влажна камера върху парафинови срезове с дебелина 6 μm. За самите имунохистохимични реакции бяха използвани първични антисеруми/антитела, а реакционните продукти бяха визуализирани чрез видовоспецифични биотинилирани вторични антисеруми (табл. 1).

Като хромоген за оцветяване беше използван 3,3‘-диаминобензидин (DAB) под микроскопски визуален контрол. При имунохистохимията за SP в областта на проксималния и дисталния колон, реакцията беше допълнително подсилена с 0.05% никел амониев сулфат, а в областта на аналния канал вместо DAB, като хромоген беше използван SG (Vector Labs).

6. Обработка и анализ на изображенията

Препаратите бяха разглеждани и заснети с изследователски микроскоп Nikon Eclipse 80i (Japan), оборудван с цифрова камера DMX 1200c. Заснемането и анализът на изображенията бяха извършени с помощта на компютърна система за анализиране на образи NIS-Elements Advanced Research (Ver. 2.30). Дигиталните снимки бяха записани в TIF-формат и обработени с помощта на Adobe Photoshop CC софтуер (Adobe System Inc., San Jose, CA).

7. Сравнителен анализ

Фотомикрографските снимки от имунохистохимичните реакции бяха конвертирани в 8-битова черно-бяла скала. С помощта на ImageJ Analysis софтуер (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), интензитетът на имуноцветяване на невроналните тела с диапазон 0 – 255 (черно – 0, бяло – 255) беше измерен и подготвен за статистически анализ. Събраните данни бяха представени във вид на диаграми тип „кутия с мустачки“.

Данните са анализирани с помощта на теста на *Kruskal-Wallis*, който е непараметрична алтернатива на еднофакторния дисперсионен анализ за съпоставка на три и повече групи (извадки). За анализ на специфичните двойки проби за стохастично доминиране поотделно приложихме сравнителния тест на *Dunn*. Статистическият анализ беше осъществен чрез софтуер GraphPad Prism®6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Разликите бяха отчетени като статистически значими при $p<0.05$.

Таблица 1. *Списък на антисерумите, приложени при имунохистохимичните реакции.*

	Антисерум	**Снабдител**	**Гостоприемник/ Тип**	**Работно разреж-дане**
Първичен	Холин ацетилтрансфераза (ChAT), PA1-4738	Thermo Fischer	Заек/ Поликлонално	1:100
	АТФ синтаза, LS-C74411	Life Span BioSciences	Мишка/ Моноклонално	1:100
	Субстанция P (SP), ab67006	Abcam	Заек/ Поликлонално	1:1000
	Азотен оксид синтаза (nNOS), PA1-38835	Thermo Fischer	Заек/ Поликлонално	1:50
Вторичен	Антизаешки IgG, ab207995	Abcam	Коза, биотинилиран	1:500
	Антимиши IgG, BA-9200	Vector Laboratories	Коза, биотинилиран	1:500

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

1. Общи съображения

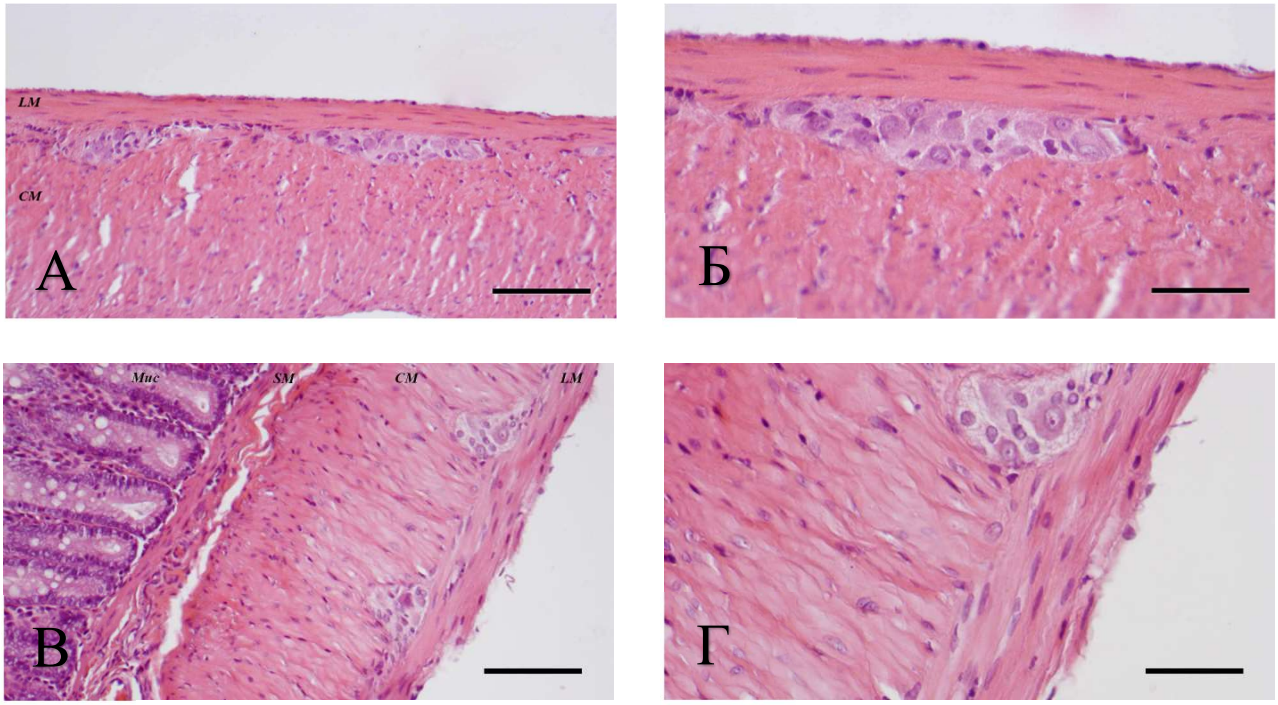
Експерименталната дейност в това проучване е изцяло основана на обследването на срезове през чревната стена. Работата на срезове дава задоволителна представа за особеностите както на МС, така и на всички останали елементи на чревната стена. По този начин лесно се диференцират лигавицата, подлигавичния слой, мускулния слой и външната обвивка на съответния чревен сегмент. На срезове ясно се визуализират мускулните подслоеве, както и тяхната характерна за червата ориентация: вътрешен слой с циркулярен ход на гладкомускулните клетки и външен слой с надлъжен ход. Това от своя страна обуславя характерния им микроскопски облик и предоставя възможност за точно локализиране на МГ, разположени между тях. Тази задача е относително лесна на препаратите, отразяващи нормалната морфология на сплита. Един от основните фактори, които следва да се вземат предвид при анализа на находките е ориентацията на срезната равнина спрямо оста на червото или, по-конкретно, спрямо равнината на МС.

2. Неспецифични оцветявания

2.1. Оцветяване с ХЕ

Рутинното оцветяване с ХЕ позволява послойното разглеждане на чревната стена и локализиране на МГ (фиг. 1, 2). Освен това, то дава обща представа за количествените и качествените характеристики на ганглийната система. С известни ограничения това оцветяване визуализира перикарионите и позволява отдиференцирането на невроните от останалите клетъчни типове, определянето на морфометричните им характеристики и сравнението на последните с тези на околните структури.

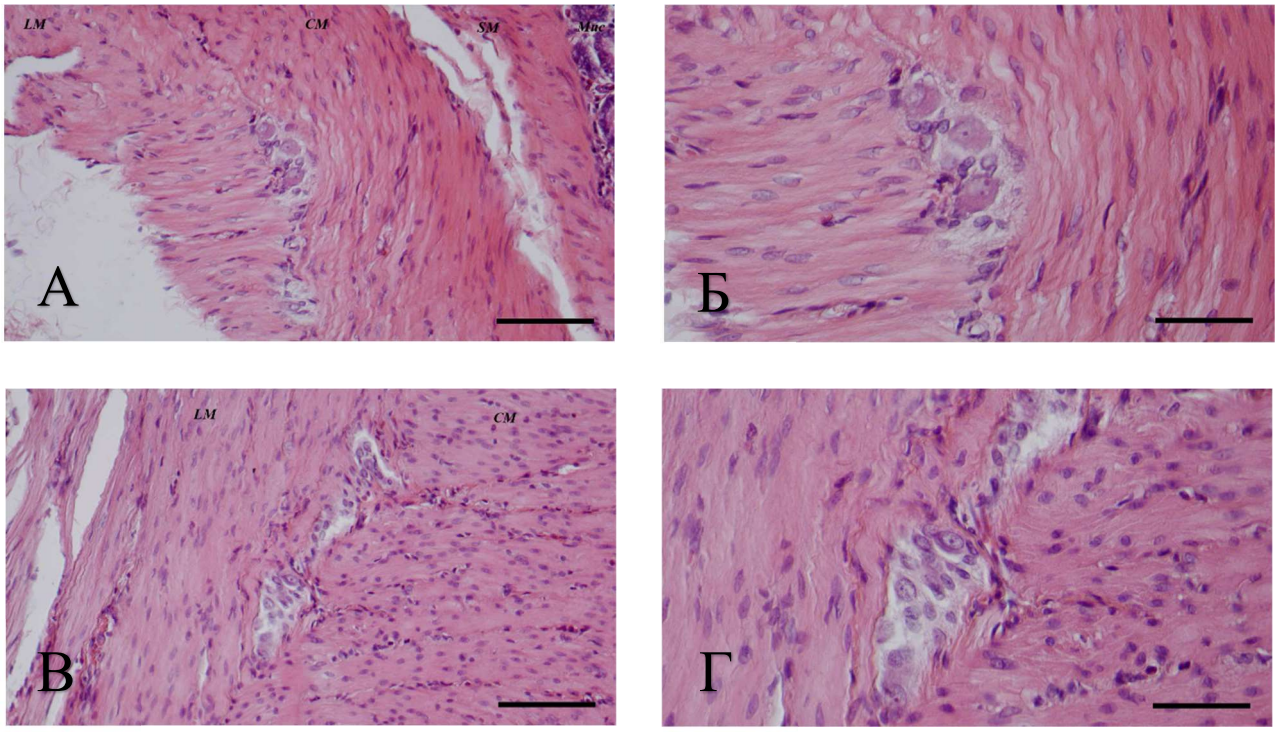
Различната пространствена ориентация на среза предостави различен изглед на мускулните влакна. На напречните срезове, влакната на ЦМП бяха прерязани по дългата си ос, а на НМП – по късата, като същото беше валидно и за издължените им ядра. При надлъжните срезове находките бяха реципрочни на описаните (фиг. 1). При тангенциалните срези дългата ос на мускулните влакна най-често се среща под прав ъгъл в областта на разположения между мускулните подслоеве МС (фиг. 2А, Б). Необходимо е стриктна диференцировка на тези слоеве, тъй като при увеличения от порядъка на х400, в зрителното поле не попадат останалите слоеве на чревната стена. Това може да доведе до погрешното им определяне и до неправилна интерпретация на находките.



Фигура 1. Оцветяване с ХЕ на надлъжни срезове от проксимален (А, Б) и дистален (В, Г) колон на плъх на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. МГ се откриват в областта между двата мускулни слоя. Muc – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm; Б, Г – 50 μm.

МГ бяха разположени в ограничени разширени пространства между мускулните подслоеве. Не открихме съществени визуални различия в структурата им при различната ориентация на срезовете. Изготвените от нас препарати обхванаха цялото протежение на КРО: проксимален колон (фиг. 1А, Б), дистален колон (фиг. 1В, Г), ректум (фиг. 2А, Б) и анален канал (фиг. 2В, Г). Във всички отдели ганглиите показаха сходни морфологични особености. Те бяха разположени строго в граничната област между ЦМП и НМП. При наблюденията не установихме те да отделят мускулно-клетъчна маса от единия слой и да я „прибавят“ към другия. Тънкият слой съединителна тъкан, който често се установяваше между двата мускулни подслоя директно продължаваше в периферията на ганглиите. Интересно е да се отбележи, че тази структура в никакъв случай не наподобяваше добре оформен и плътен съединителнотъканен слой, какъвто по правило се наблюдава при ганглиите на автономната нервна система. Вместо това, той имаше вид на тънък слой от рехава тъкан, съдържащ не повече от един ред клетки с относително малки размери. Техните ядра бяха малки и хетерохромни. По тези причини ганглиите по-скоро изглеждаха лишени от собствена капсула и визуално бяха разположени сред рехавата съединителна тъкан, разделяща двата мускулни слоя.

Наблюдаваните от нас МГ имаха твърде вариабилни размери. По визуална оценка, най-големите надхвърляха 500 μm по дългата си ос. Формата на ганглиите беше издължена, като дългата им ос беше ориентирана успоредно на чревната стена. По вертикалната си ос, те съдържаха между 1 и 5 реда клетки, много рядко повече. От тях невроните несъмнено бяха числено малцинство. Само при извънредно малък брой ганглии установихме наличие на повече от един неврон по късата ганглийна ос.



Фигура 2. Нормална морфология на МС в аноректалната област на плъх, визуализирана чрез оцветяване с ХЕ на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. А,Б – Тангенциален срез от ректум. Б, Г – Надлъжен срез от анален канал. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

Във вътрешността на ганглиите открихме три основни структурни елемента – невронални тела, глиални елементи и снопове от влакна. Невроналните тела съдържаха присъщата за тях гранулирана, базофилна цитоплазма. Техните ядра бяха относително големи, окръглени и хипохромни, често с ясно отграничимо ядърце. Формата на телата най-често беше окръглена или леко издължена. В случаите, когато те попадаха в равнината на среза, се наблюдаваха и клетъчни израстъци. Броят на невроните варираще и при по-големите ганглии достигаше до 8.

Другият откриван клетъчен тип бяха осезаемо по-дребни клетки, отговарящи по структура на глиални клетки. Техните ядра бяха слабо издължени и хетерохромни.

Пространството между клетъчните елементи в ганглиите беше запълнено с рехава тъкан, често имаща фибриларен характер. Не установихме наличие на миелинизирани влакна с присъщия за тях облик.

Поради неспецифичния характер на оцветяването с ХЕ, не установихме недвусмислено наличие на невронални структури в двата подслоя на *tunica muscularis.*

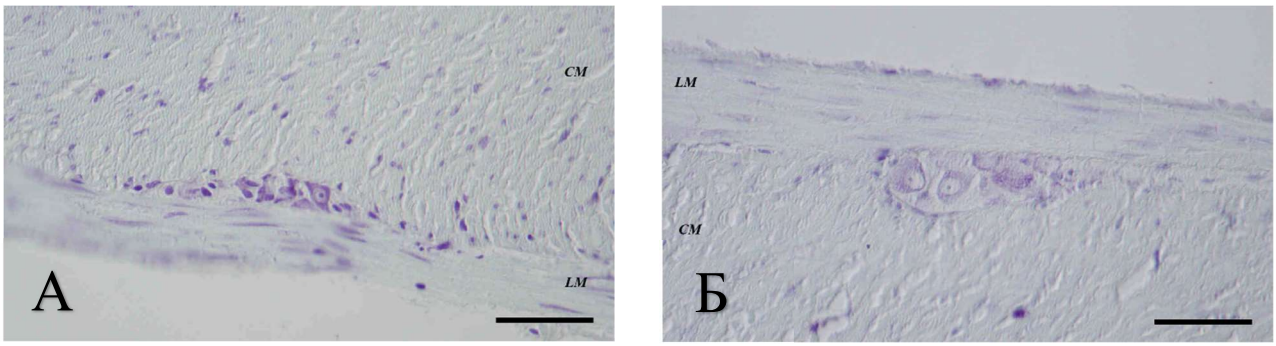
2.2. Оцветяване по Nissl

За изследване на морфологията на миентералните неврони използвахме оцветяване с крезил виолет по *Nissl*. При това оцветяване клетъчните контури контрастно се открояват от околните структури, поради високия афинитет на боята към невроналния гранулиран ендоплазмен ретикулум (т.нар. Нислови гранулации). Поради негативната реакция на ядреното съдържимо, контурът на ядрото също е ясно различим.

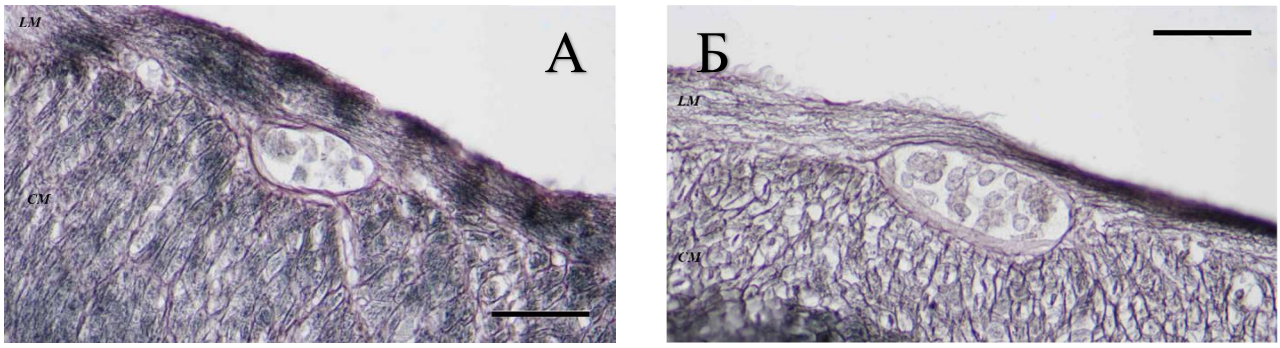
Проведеното от нас изследване е в областта на проксималния (фиг. 3А) и дисталния (фиг. 3Б) колон. Преобладаващата част от наблюдаваните неврони бяха с полигонална форма, но се откриваха и окръглени. Цитоплазмата им беше фино гранулирана от Нисловите гранулации. Ядрата бяха неоцветени; формата им беше кръгла, а контурите – ясно очертани. Наблюдаваше се добре оформено ядърце с интензивна реакция на оцветяване. При невроните с триъгълна или многоъгълна форма, на късо протежение спрямо перикариона можеха да се проследят оцветени и добре отграничени дендритни израстъци.

На препаратите добре се открояваха малките, издължени ядра на ентералната глия, поради силното натрупване на боя в тях. Пространствата между клетките в ганглиите изглеждаха оптически празни. В ограничени участъци на някои от ганглиите се различаваше слабо осветена субстанция с мрежест характер, най-вероятно отговаряща на снопове нервни влакна.

Както може да се очаква, гладкомускулните клетки не бяха оцветени, като изключим ядрата им, които показаха среден интензитет на оцветяване. Поради афинитета на оцветителя предимно към Нисловите гранулации, пигментирани влакна в мускулните подслоеве не се установиха. При визуализиране с този метод на външната морфология и физическите характеристики на ганглиите, вкл. форма, размери, клетъчен брой и др., не открихме разлика с тези, рутинно оцветени с ХЕ.



Фигура 3. Оцветяване по Nissl на надлъжни срезове от проксимален (А) и дистален (Б) колон на плъх на голямо увеличение. МГ се откриват в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 µm.



Фигура 4. Нормална морфология на граничната област на МГ, визуализирана чрез оцветяване по Gomori в количната област на голямо увеличение. Наблюдава се концентрация от ретикуларни влакна в периферията на ганглиите. А – Надлъжен срез от проксимален колон. Б – Надлъжен срез от дистален колон. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 µm

2.3. Сребърна импрегнация по *Gomori*

Тази методика често се използва в хистологичната практика за визуализация на ретикуларни влакна. Тя беше приложена от нас върху срезовете през чревната стена с цел да бъдат изследвани характеристиките на наличната съединителна тъкан около и вътре в ганглиите. Наблюдаваните препарати са от областта на проксималния (фиг. 4А) и дисталния (фиг. 4Б) колон.

Находките при всички изследвани сегменти на дебелото черво бяха сходни: в областта между мускулните подслоеве се наблюдаваше тънък слой с позитивна реакция. Той беше в директен контакт с намиращите се в съседство гладкомускулни слоеве и продължаваше без прекъсване в мрежовидна структура, заобикаляща от всички страни мускулните клетки в цялата дебелина и на двата мускулни подслоя. В областта на МГ, този слой се разцепваше и продължаваше без прекъсване по периферията на ганглиите. На тези места той отново беше в директен контакт с гладкомускулните клетки и се сливаше с пигментираната мрежовидна структура около тях. По визуална оценка

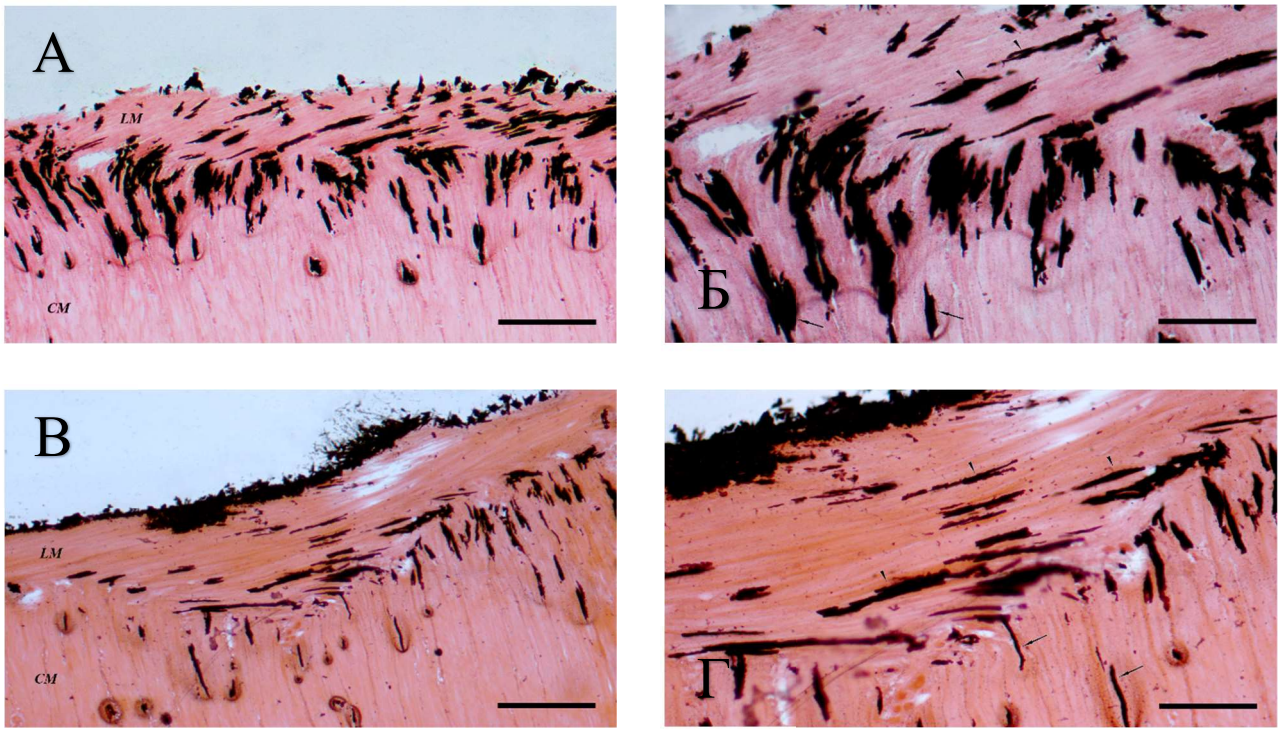
ретикуларният слой обикалящ ганглиите беше леко задебелен, в сравнение с този в участъците лишени от ганглии.

От вътрешната страна на този ретикуларен слой, т.е. между него и ганглийните клетки, наблюдавахме значително по-дебела структура със слоест строеж, но с отрицателна оцветителна реакция. Клетъчните елементи, както в ганглиите, така и в мускулните слоеве бяха слабо оцветени.

В обобщение, така описаните структури наподобяваха базална ламина с високо съдържание на ретикуларни влакна, разделяща двата мускулни слоя. В областта на МГ тя се разцепва и ги обвива. На тези места тънката пластинка от влакна беше с по-голяма дебелина.

2.4. Сребърна импрегнация по *Golgi*

Друг метод на оцветяване, който често се използва в практиката за визуализация на нервни елементи е импрегнационната техника по *Golgi* със сребърен нитрат. Широкото приложение на метода се основава на високия афинитет на среброто към плазмените мембрани на невроните и глията. Наблюдаваните находки са от областта на проксималния (фиг. 5А, Б) и дисталния (фиг. 5В, Г) колон.



Фигура 5. Сребърна импрегнация по Golgi, приложена върху тангенциални срезове от проксимален (А, Б) и дистален (В, Г) колон на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. В черно се наблюдават нервните структури, пронизващи мускулните слоеве. CM – циркулярен мускулен слой, LM – надлъжен мускулен слой. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

Локализирането на МС на изготвените от нас препарати не представляваше трудност, поради контрастиращото оцветяване на нервните

елементи в черен цвят. В допълнение, приложеното от нас контраоцветяване с еозин предостави възможност за ясно отграничаване на двата мускулни подслоя на чревната стена. От своя страна, това даде недвусмислена информация за пространствените взаимоотношения между МС и околните структури.

МС се визуализираше в две основни конфигурации. Първата от тях беше като непрекъсната прослойка от нервни структури с неравни граници и с интензивно черен цвят, разположена между двата еозинофилни мускулни подслоя. Въпреки хомогенното оцветяване, на определени места се забелязваха овални задебеления, свързани със стеснени участъци, най-вероятно отговарящи съответно на МГ и интерганглионерните им връзки. В другата конфигурация наблюдавахме плексуса като отделни, хомогенно оцветени в черно образувания, с неправилна форма и неравни контури (фиг. 5). Както се забелязва, описаните варианти на визуализация бяха наблюдавани и в двата изследвани отдела, в които приложихме тази методика.

Независимо от конкретния тип на презентация на сплита, честа находка на всички изготвени препарати бяха отделни обособени импрегнирани структури в ЦМП и НМП. На надлъжните срезове те представляваха овални телца, разположени в подчертана близост до МС. На тангенциалните срези (фиг. 5) те имаха издължена влакнеста структура, ориентирана успоредно на хода на околните мускулни влакна. Поради косия ход на среза на тези препарати те изглеждаха сякаш се срещат под прав ъгъл в областта на МС. Визуално не отчетохме преобладаване на споменатите образувания в някой от двата подслоя.

Бяха наблюдавани и хистологични препарати на червото, на които оцветяване в мускулните подслоеве привидно липсваше. Въпреки това, на голямо увеличение (х400) сред еозинофилните мускулни влакна на ЦМН се забелязваха фини точковидни находки, типични за аксонални варикозитети. Те се наблюдаваха и в двата изследвани чревни сегмента и колективно образуваха прекъснати линии, успоредни на мускулните влакна.

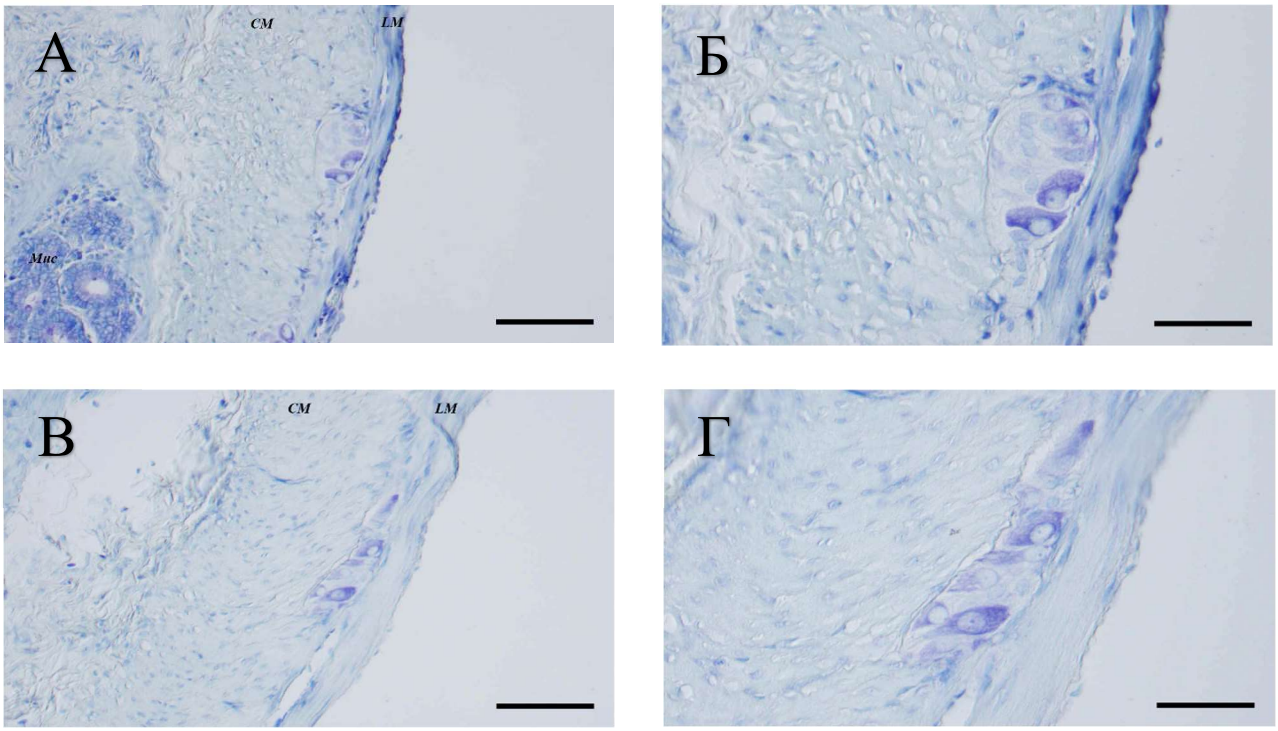
Отчетлива находка, наблюдавана на всички изготвени препарати, беше значителното натрупване на аргирофилни структури по външната повърхност на НМП. На част от препаратите, то беше организирано в отделни образувания с неправилна форма и неравни контури (фиг. 5А, Б). В други участъци, оцветените структури имаха непрекъснат характер, отново с неравни контури. От тях започваха дървовидно разклонени фини влакнести структури, разклоняващи се извън пределите на чревната стена (фиг. 5В, Г).

При по-обзорните фотомикрографски изображения, на които присъства и подлигавичният слой, в последния също се наблюдаваха оцветени структури, макар и в по-оскъдно количество. Най-често те бяха с овална форма, поединично

или в малки групи. Често тези находки бяха разположени на границата между субмукозата и ЦМП.

2.5. Оцветяване с толуидиново синьо

Толуидиновото синьо е основен тиазинов метахроматичен оцветител с подчертан афинитет към химични вещества с кисел характер като ДНК и РНК. По тази причина, освен за витално оцветяване при диагностични процедури в клинична обстановка, той успешно се използва за локализация на определени клетъчни и тъканни типове. Сред тях са метахроматично оцветяващите се гликозаминогликани в муцина, мастоцитните гранули, хрущялния матрикс, както и Нисловите гранулации в невроналната цитоплазма.



Фигура 6. Фотомикрографска снимка показваща оцветени с толуидиново синьо миентерични ганглии на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. А, Б – Надлъжен срез от проксимален колон. В, Г – Надлъжен срез от дистален колон. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – циркулярен мускулен слой, LM – надлъжен мускулен слой. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

Това оцветяване не носи предпоставка за визуализиране на всички елементи на чревната стена. Изтъкваме последното с оглед на ниския афинитет на оцветителя към мускулната тъкан. Въпреки това, поради интензивното оцветяване на лигавичните жлези и ентералните нервни елементи, определянето на границите на слоевете на чревната стена не представляваше трудност. Поради наличието на пигментирани неврони, МГ бяха различими, но не показваха

отчетливо оцветени граници с околните мускулни подслоеве. Представени са препарати от областта на проксималния (фиг. 6А, Б) и дисталния (фиг. 6В, Г) колон.

Цитоплазмата на миентералните неврони имаше фино гранулиран вид, оцветена с нативния за оцветителя тъмносин цвят. Формата на наблюдаваните перикариони беше неправилна, с множество израстъци, наподобяваща мултиполарна морфология. Клетъчните контури бяха отчетливи, контрастиращи на оптически празния фон. Типичните за невроните еухромни ядра бяха неоцветени или слабо оцветени, с кръгла форма и относително големи размери, а ядърцето е ясно откроимо поради интензивното си оцветяване. Макар и неоцветени, около невроните се различаваха контурите на други клетки със значително по-малки размери.

На част от препаратите се наблюдаваше интензивно оцветена влакнеста структура по външната повърхност на НМП, отговаряща по положение на субсерозния сплит (фиг. 6 А, Б). Освен това на обзорните фотомикрографски снимки, на фона на интензивно оцветения в синьо лигавичен слой, сред жлезния епител се забелязваха оцветените в лилаво чашковидни клетки, което е проява на β-хромазия (фиг. 6А).

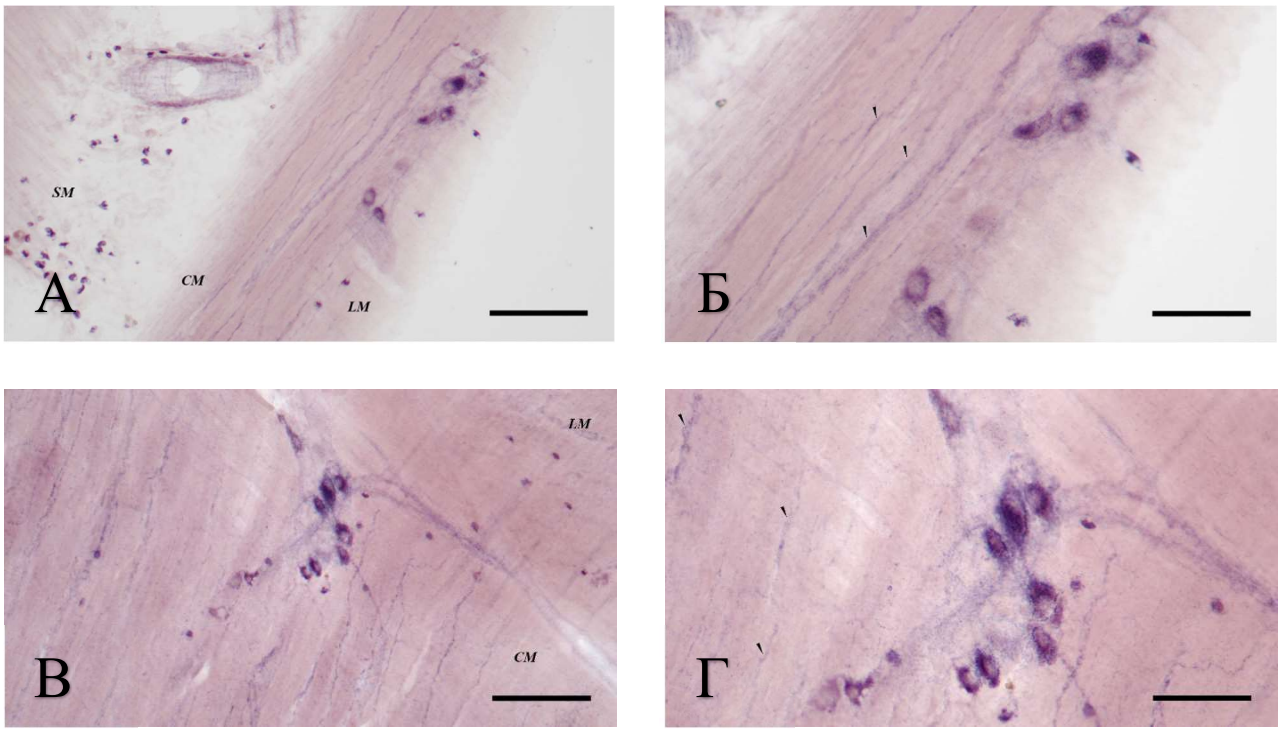
Не установихме видими морфологични разлики в структурата на МГ и техните неврони в изследваните чревни сегменти.

3. Хистохимична реакция за визуализиране на NADPH-d.

Препаратите при които бе използвана тази техника са предимно на тангенциални срезове и демонстрираха значително присъствие на NADPH-d–позитивни структури. Последните показаха различна степен на интензитет на оцветяването, който ще бъде описан в т. 5 на този раздел. Препаратите бяха изготвени от проксимален колон (фиг. 7А, Б), дистален колон (фиг. 7В, Г), ректум (фиг. 8А, Б) и анален канал (фиг. 8В, Г).

В ганглиите, броят на NADPH-d–позитивните неврони вариране от 3-4 при по-малките ганглии (фиг. 7А, Б), до 15-16 при по-големите (фиг. 8 В, Г). Цитоплазмата изглеждаше гранулирана, като интензитета на оцветяването беше осезаемо по-слаб в колона, в сравнение с аноректалната област.

В проксималния и дисталния колон интензитетът на оцветяване беше нисък при около половината наблюдавани неврони в ганглия и среден при другата половина (фиг. 7). При първата група можем да опишем оцветяването като цитоплазмено натрупване на гранули в количество, недостатъчно за видимото очертаване на контурите на клетъчното тяло. Тъй като в тези случаи контурът на негативното ядро е трудно установим, клетките наподобяват окръглени полета с точковидни цитоплазмени натрупвания. При втората група неврони



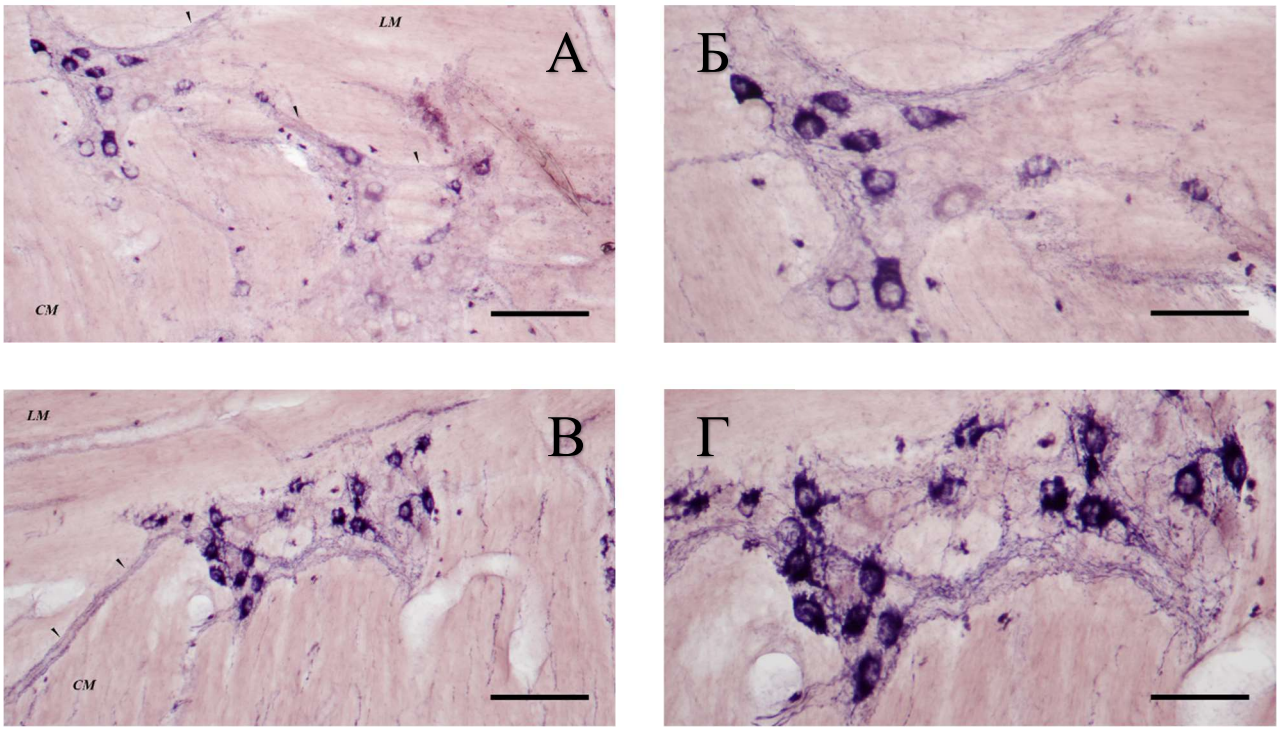
Фигура 7. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален (А, Б) и дистален (В, Г) колон на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. Сред циркулярния мускулен слой се наблюдават снопчета реактивни варикозни нервни влакна с успореден ход (глави на стрелки). SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

(със среден интензитет на оцветяване), гранулите са в количество, позволяващо грубо контуриране на клетъчната форма, а ядрото остава като ясно обособен окръглен или овален неоцветен участък.

Във вътрешността на ганглиите на част от препаратите открихме дифузно разпръснат слабопигментиран материал, който не би могъл да бъде определен като част от обособени неврони. Поради това в доста ганглии могат да се наблюдават ясните контури на невронални тела, лишени от каквото и да е оцветяване.

При еднакви условия на изработване на препаратите, оцветяване на значителна част от невроните в аноректалната област може с лекота да бъде определено като силно (виж т. 5). Невроните със слаб и среден интензитет на оцветяване, а също и неоцветените такива, процентно бяха значително по-малко. При силно оцветените неврони цитоплазмените гранули бяха толкова многобройни и интензивно пигментирани, че цитоплазмата изглеждаше хомогенно оцветена (фиг. 8).

Както изтъкнахме по-горе, препаратите от тази група са изготвени на тангенциални срезове. По тази причина равнината на среза преминава през



Фигура 8. Хистохимично демонстриране на реакционен продукт за NADPH-d на тангенциален срез от ректум (А, Б) и анален канал (В, Г) на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Реакционни преципитати от NADPH-d очертават контурите на интерганглионерните връзки (глави на стрелки). СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

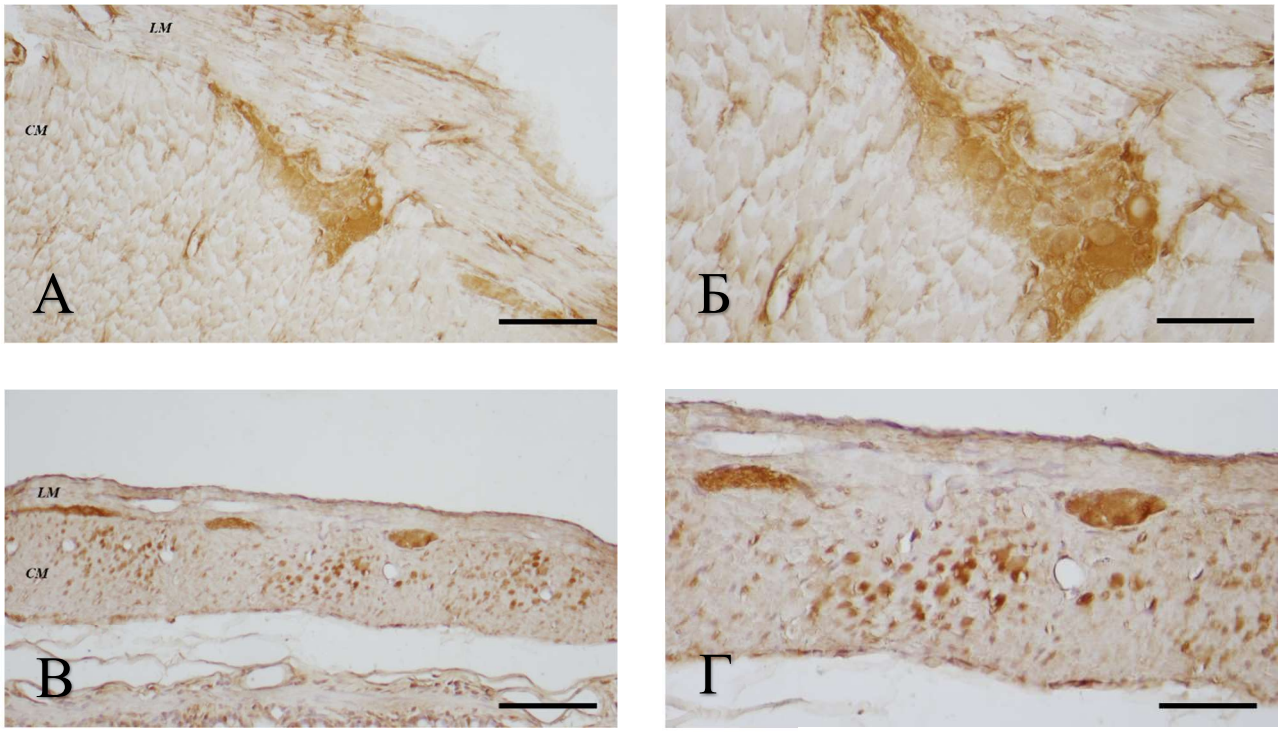
невронални тела по оптимален спрямо тяхната триизмерна форма начин. Това от своя страна, би позволило да се правят изводи за конкретната принадлежност на определени неврони към даден морфологичен тип.

Освен NADPH-d–позитивните неврони, на повечето препарати недвусмислено се визуализираха снопове от миентерални нервни влакна в ЦМП и НМП. Тяхното оцветяване в колона е слабо, но въпреки това те контрастират на фона на изцяло неоцветените гладкомускулни влакна. Интраганглионерно се наблюдаваха снопове от нервни влакна с различна посока, образуващи ясно отчетлива мрежа (фиг. 7В, Г), докато в областта на интерганглионерните връзки те имаха подчертано паралелен ход (фиг. 7В, Г; 8В, Г). Точно както при невроните, и при влакната се наблюдаваше осезаемо по-интензивно оцветяване в аноректалната област, в голяма степен дължащо се на варикозните разширения, наблюдавани по хода на влакната (фиг. 8).

4. Имунохистохимични реакции

4.1. Имунохистохимия за ChAT

Холинергичните неврони в МС бяха визуализирани имунохистохимично с помощта на антитела към ацетилхолин-синтезиращия ензим ChAT. Имунопозитивни тела на холинергични неврони бяха постоянна находка във всички изследвани сегменти на дебелото черво. Формата им вариираше, но се наблюдаваше подчертана предоминация на неправилната перикарионна форма с множество израстъци (фиг. 9).



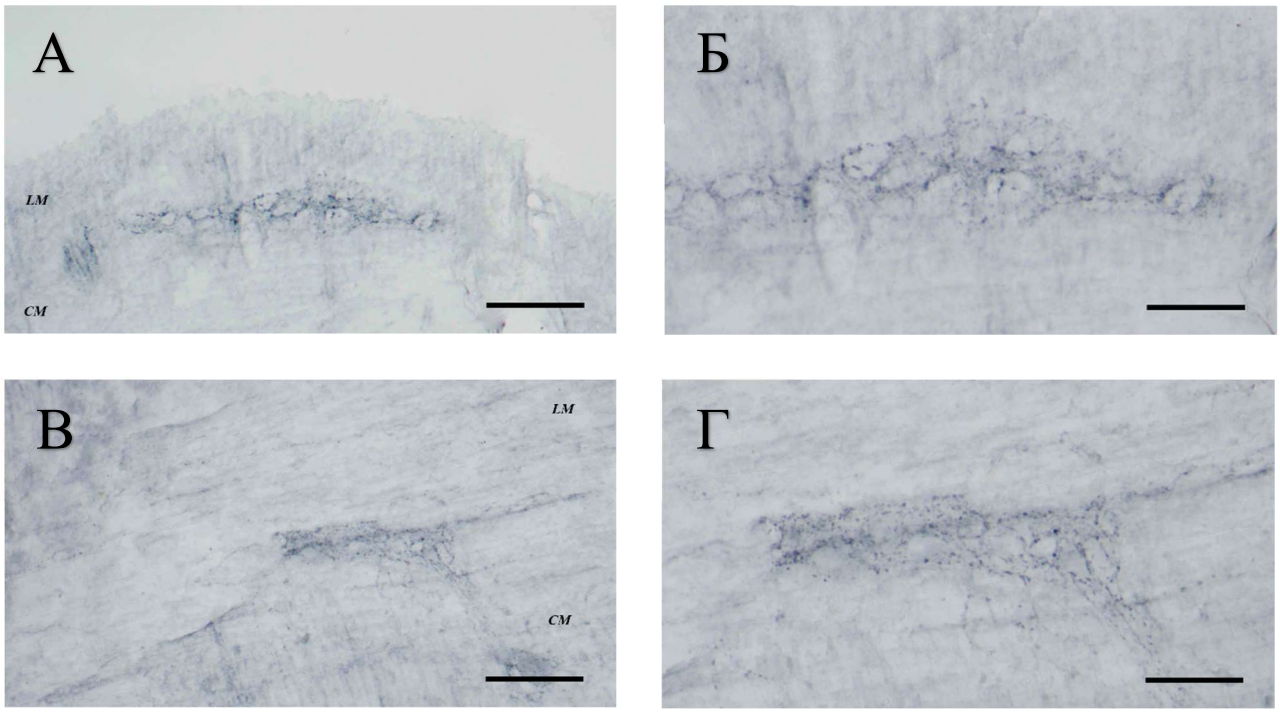
Фигура 9. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури в количната област на плъх на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. А, Б – тангнециален срез от проксимален колон. В, Г – надлъжен срез от дистален колон. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

Цитоплазмата на отделните имунопозитивни неврони показваше различия в интензитета на оцветяване (виж т. 5). Ядрата на всички неврони бяха с кръгла форма и относително големи размери, слабо оцветени или неоцветени. Част от ганглиите съдържаха имунонегативни невронални тела, но с ясно обособени контури (фиг. 9А, Б). В пределите на ганглиите, освен перикарионите на холинергичните неврони, се откриваха и влакнести структури с променлива посока. Поради съществото натрупване на оцветител повсеместно в ганглиите, техните контури бяха ясно отграничими на фона на имунонегативните мускулни подслоеве.

ЦМП и НМП притежаваха подчертано стрииран вид поради наличието на множество имунопозитивни влакна, ориентирани успоредно на оста на гладкомускулните клетки. В зависимост от ориентацията на среза, те бяха надлъжно, косо или напречно прерязани. На част от препаратите, предимно такива от дисталния колон, напречно прерязаните влакна се наблюдаваха като овални телца с неясни контури, често достигащи значителни размери (фиг. 9 В, Г).

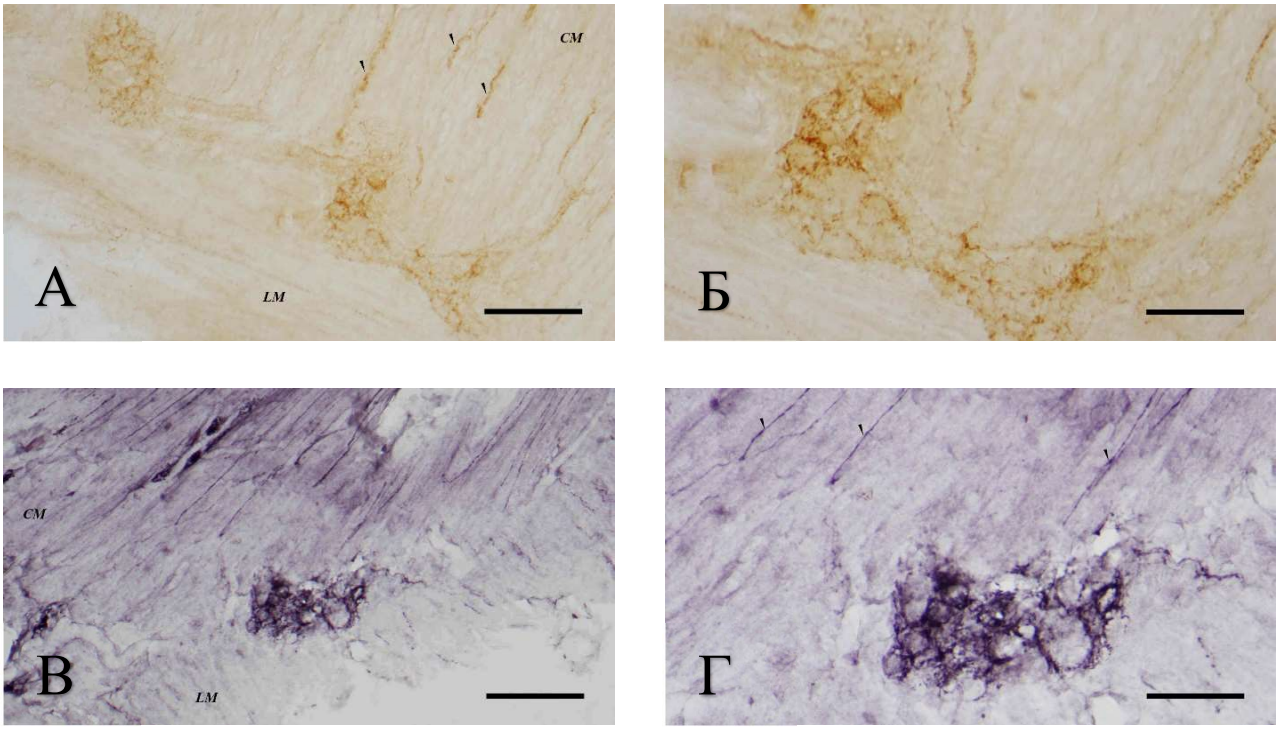
4.2. Имунохистохимично доказване на SP

След като определихме предполагаемата равнина на МС на малко увеличение, ние наблюдавахме видими струпвания от имунореактивен материал, отговарящи на МГ. На по-голямо увеличение забелязахме изобилие от имунореактивни влакна, образуващи характерни перисоматични варикозитети. В проксималния (фиг. 10А, Б) и дисталния колон (фиг. 10В, Г) не установихме наличие на никакви имунопозитивни невронални тела. Въпреки това, имуноцветените нервни влакна преминаваха по периферията на имунонегативни пространства, които видимо съответстваха по форма и размери на невронални тела. Освен това, влакната бяха толкова контрастиращи, че позволяваха да се определят



Фигура 10. Експресия на SP в нервни структури на тангенциални срезове от проксимален (А, Б) и дистален (В, Г) колон на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. След никелова интензификация, имунопозитивната реакция се маркира в тъмносиньо. По хода на нервните влакна се наблюдават реактивни варикозитети, очертаващи контурите на имунонегативни невронални тела. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

клетъчните контури. Въпреки че такива се откриваха в целите ганглии, най-отчетливите аксонални варикозитети бяха именно тези, видяни в непосредствен контакт с имунонегативните клетъчни тела (фиг. 10А-Г). Лесно забележими бяха и интергангионерните връзки, разположени между двата мускулни слоя, поради тяхната силно изразена имунореактивност и наличие на варикозитети (фиг. 10В, Г). В ЦМП регистрирахме трудно отграничими имунореактивни нервни влакна, ориентирани успоредно на гладкомускулните влакна. Интензитетът на оцветяването беше значително по-слаб от този в интерганглионерните връзки, а имунореактивните варикозитети бяха по-малобройни.



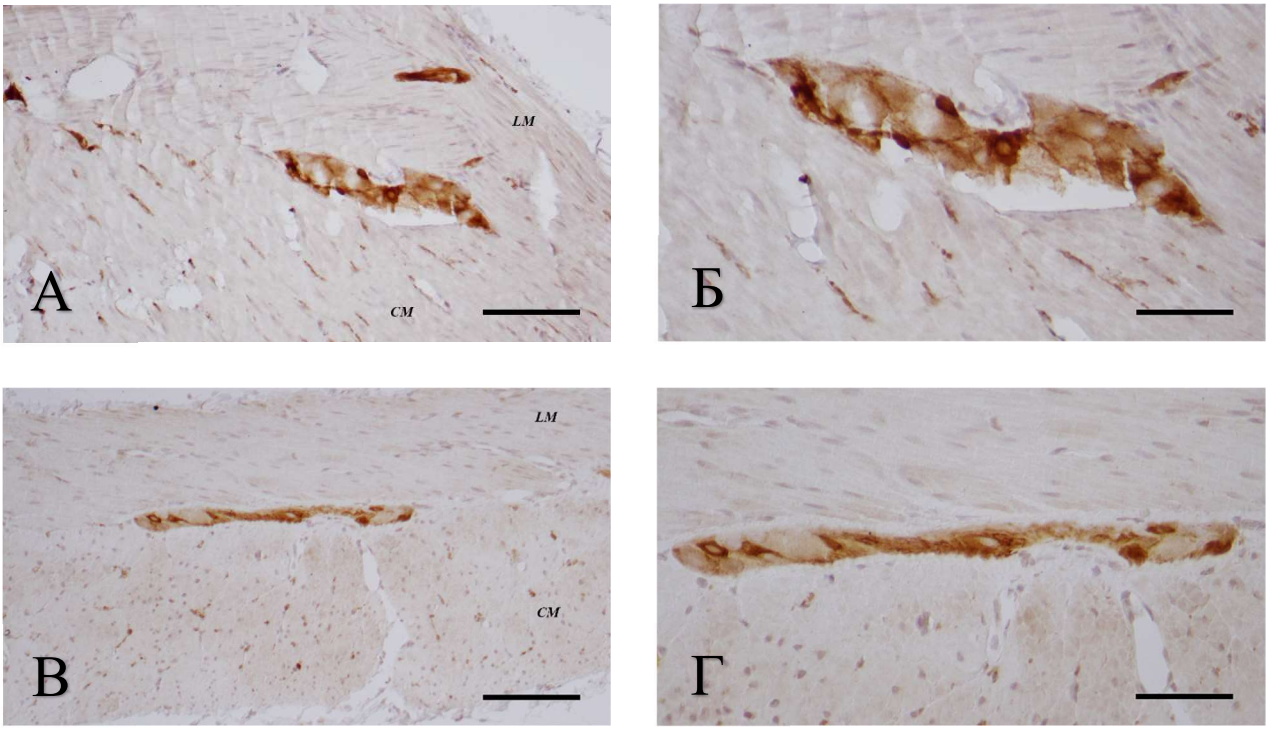
Фигура 11. SP-имунореактивност наблюдавана на тангенциални срезове от аноректалната област на плъх на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. В периферията на имунонегативни перикариони се установяват снопчета от имунореактивни варикозни влакна. Същите се откриват с успореден ход и в циркулярния мускулен слой (глави на стрелки). А, Б – Ректум. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво, визуализирана с DAB. В, Г – Анален канал. Реакцията се позитивира в тъмновиолетов цвят, оцветена с хромогена SG. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

Находките от ректума (фиг. 11А, Б) и аналния канал (фиг. 11В, Г) са напълно аналогични на тези описани при колона, въпреки прилагането на различен хромоген за визуализация на имунореакцията (съответно DAB и SG). Новост в тези две области е установеното наличие на единични имунореактивни невронални тела в част от ганглиите (фиг. 11 В, Г). Те се характеризираха с натрупване на интензивно оцветени цитоплазмени гранули в тях. В единични неврони последните бяха толкова многобройни, че придаваха на цитоплазмата

хомогенен характер. Перикарионите на тези неврони бяха с неправилна форма, поради наличието на цитоплазмени израстъци. Поради тангенциалния характер на използваните срези, интерганглионерните връзки бяха честа находка (фиг. 11А, Б). Също както в ганглиите, и те показваха варикозни разширения. В двата мускулни подслоя сноповете от имунореактивни влакна бяха лесно забележими поради интензивното им имуноцветяване, често визуализирани с вълнообразен характер и с изразени варикозни разширения (фиг. 11А-Г).

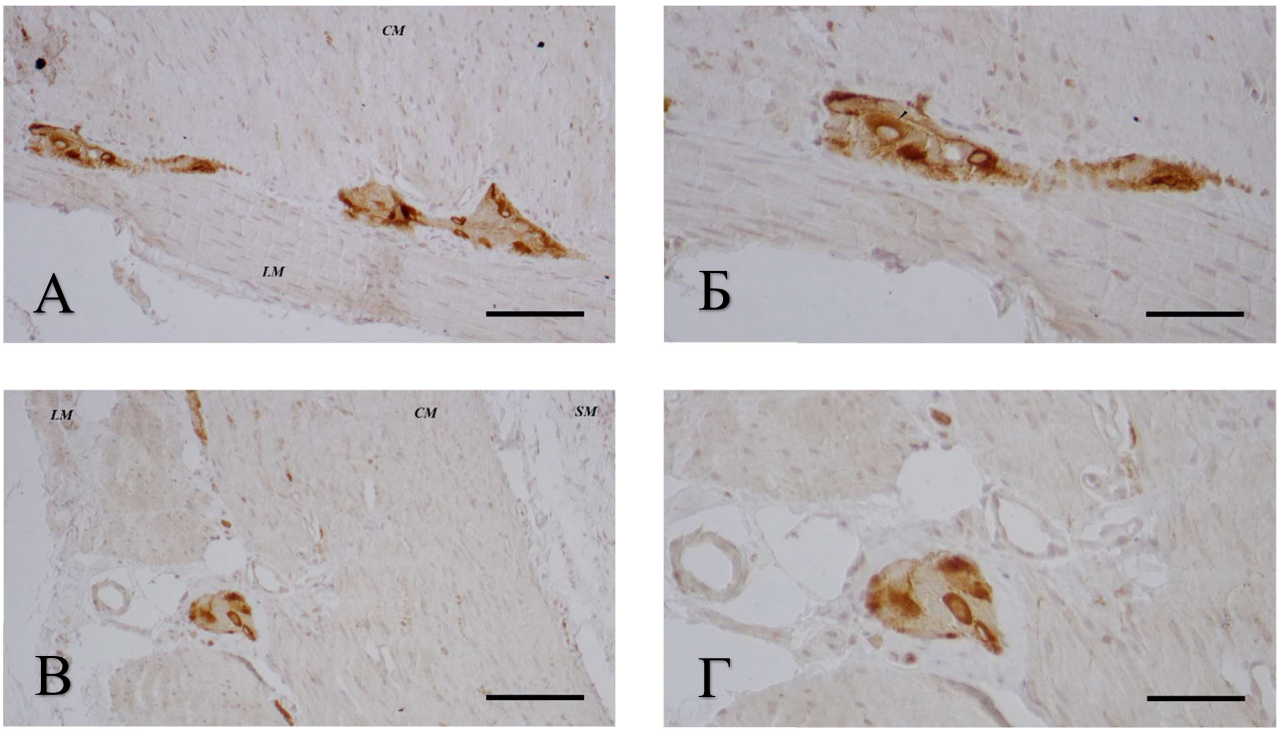
4.3. Имунохистохимия за nNOS

Изготвените за целите на имунохистохимичното доказване на невроналната изоформа на азотен оксид синтазата препарати обхващаха цялата КРО: проксимален колон (фиг. 12А, Б), дистален колон (фиг. 12В, Г), ректум (фиг. 13А, Б) и анален канал (фиг. 13В, Г). Започнахме обследването с локализиране на граничната област между ЦМП и НМП. В нея установихме наличие на клетъчни струпвания със силно интензивно и контрастиращо имунореактивно оцветяване, които недвусмислено представляваха МГ. Те притежаваха съвсем отчетливи контури поради цялостното им, макар и с променлив интензитет, оцветяване. Формата им беше разнообразна: издължена и със заострени краища (фиг. 12А-Г), окръглена (фиг. 13 В, Г) или неправилна (фиг. 13А, Б).



Фигура 12. Визуализация на имунореактивни за nNOS нервни структури в колон на плъх на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. А, Б – Тангенциален срез от проксимален колон. В, Г – Надлъжен срез от дистален колон. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

На определени места в тях се откроваха силно имунореактивни невронални тела. Формата им вариираше, но най-широко бяха застъпени полигоналните перикариони, с няколко изразени израстъка (фиг. 12А-Г; 13А, Б). В голяма част от тях се откриваше голямо, имунонегативно и често леко издължено ядро. Освен описаните силно контрастиращи тела, в по-голямо количество се визуализираха и такива със значително по-слаб интензитет на оцветяване (фиг. 12А, Б). Въпреки това техните контури бяха лесно отграничими. Това се дължеше на факта, че незаетите от невронални тела участъци от ганглиите бяха пигментирани хомогенно или имаха фибриларен вид. Това оцветяване беше със среден по сила интензитет и най-вероятно дължащо се на белязани снопове от интраганглионерни нервни влакна.



Фигура 13. nNOS имунореактивност наблюдавана на тангенциални срезове от аноректалната област на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. А, Б – Ректум. В, Г – Анален канал. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

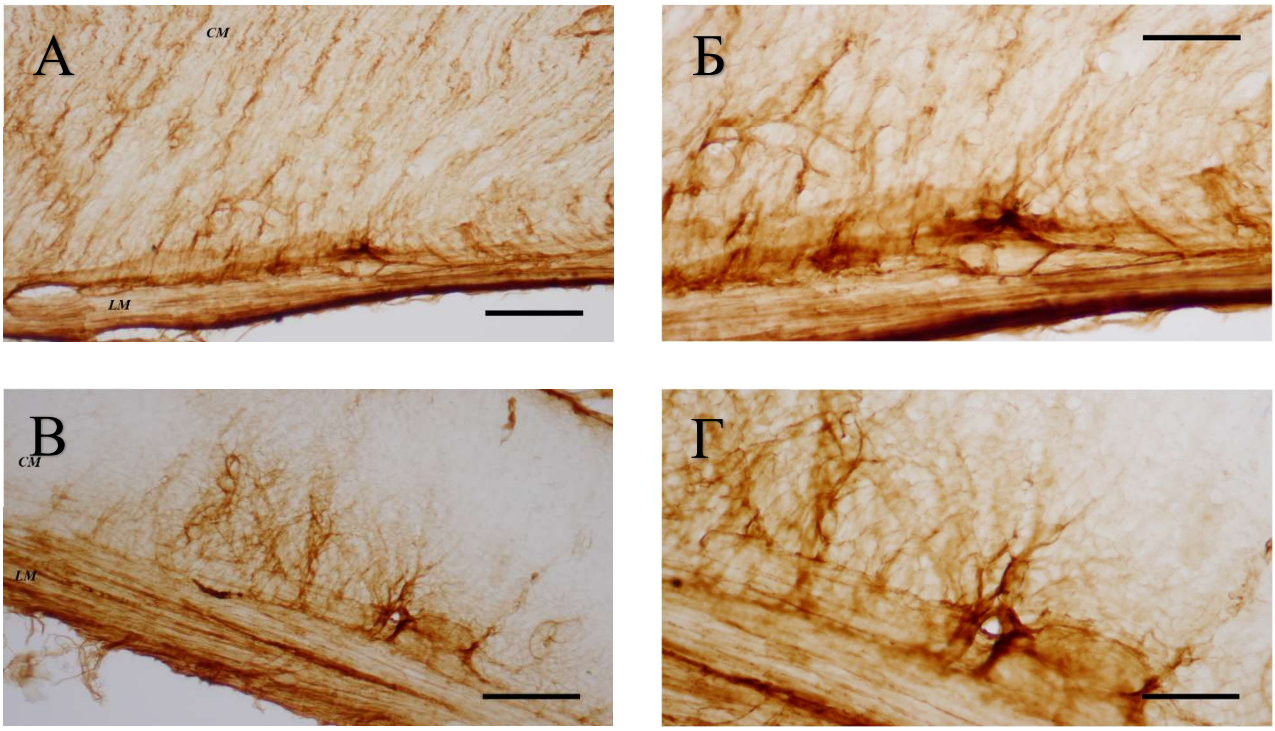
Имунореактивни интерганглионерни връзки не бяха установени. На всички препарати в ЦМП се откроваха точковидни или леко издължени струпвания на пигмент, най-вероятно в резултат на наличие на напречно или косо прерязани снопове от имунопозитивни влакна (фиг. 12, 13). Такива в НМП не се установиха.

4.4. Имунохистохимия за АТФ

Изготвените препарати за демонстриране на АТФ имунореактивност в МС са от цялото протежение на КРО: проксимален колон (фиг. 14А, Б), дистален колон

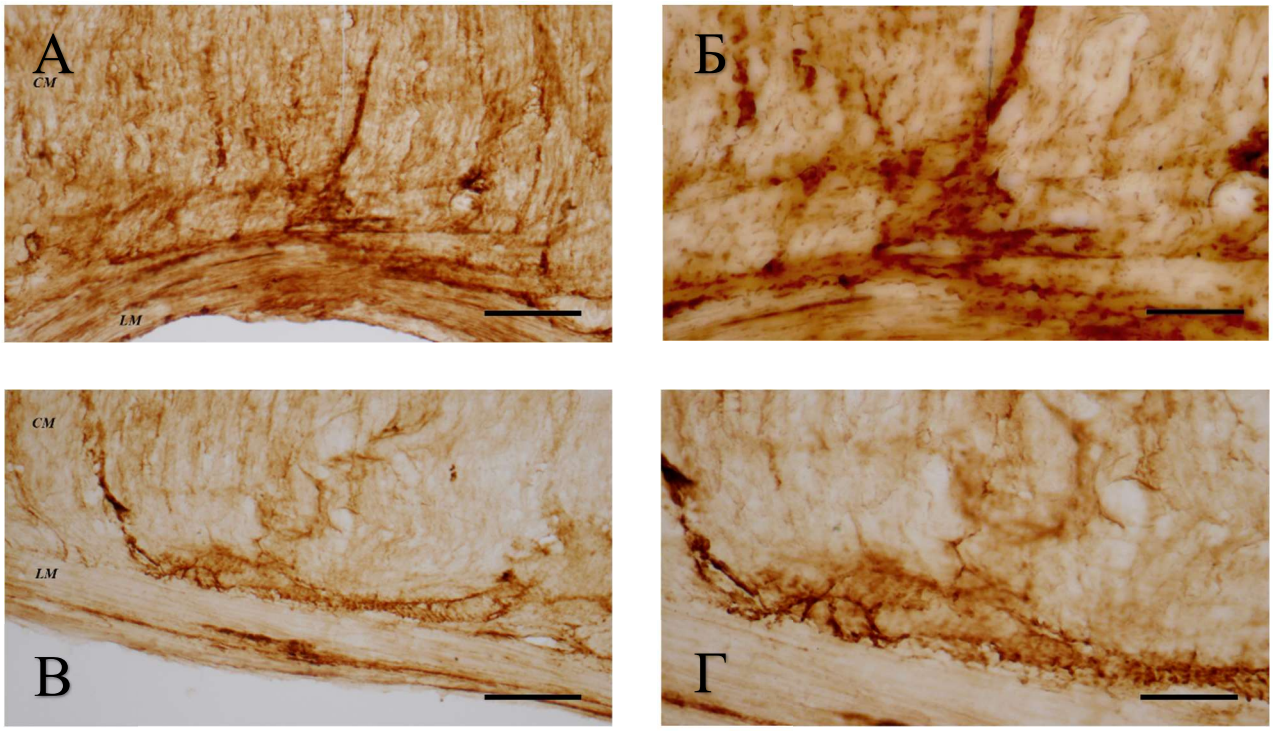
(фиг. 14В, Г), ректум (фиг. 15А, Б) и анален канал (фиг. 15В, Г). Локализирането на МС не беше трудно поради силното натрупване на пигмент в нервните структури. Въпреки това, наблюдаването на имунопозитивни неврони беше изключителна рядкост.

Поради наличието на имунореактивни нервни влакна, преминаващи по периферията на МГ, последните бяха отчетливо контурирани и отделени от околните тъкани, но за сметка на това най-често изглеждаха оптически празни. На определени места, в самите ганглии влакната образуваха точковидни структури с изглед на варикозитети, които ограждаха оптически празни полета, отговарящи по форма и големина на имунонегативни невронални тела (фиг. 15А-Г). Имунопозитивни перикариони открихме само в единични ганглии.



Фигура 14. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в нервни структури в проксимален (А, Б) и дистален (В, Г) колон на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. Реакцията се позитивира в тъмнокафяв цвят. Наблюдават се реактивни снопове влакна както в ЦМП, така и в НМП. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

Освен в сърцевината и периферията на ганглиите, на всички препарати наблюдавахме имунореактивни нервни влакна във вид на интерганглионерни нервни връзки, а също и такива, навлизащи в ЦМП. Техният ход беше паралелен на посоката на мускулните влакна. Забележителна находка при тези имунохистохимични реакции беше осезаемото наличие на снопове влакна и в НМП, което не се наблюдаваше в останалите специфични реакции, които проведохме в нашето проучване (фиг. 14, 15).



Фигура 15. Експресия на АТФ-синтаза в нервни структури при ректум (А, Б) и анален канал (В, Г) на малко (А, В) и голямо (Б, Г) увеличение. Реакцията се позитивира в тъмнокафяв цвят. Снопчета от варикозно разширени влакна се откриват в циркулярния и в надлъжния мускулен слой. CM – циркулярен мускулен слой, LM – надлъжен мускулен слой. Размерна линия: А, В – 100 μm, Б, Г – 50 μm.

5. Сравнителен анализ на МС в отделните сегменти на КРО при плъх

С цел обобщаване на събраната дотук информация, ще представим нашите находки, свързани с експресията на изследваните невроактивни вещества в таблица 2.

Данните, отнасящи се до миентеричните структури, бяха събрани при анализ на избрани области, характеризиращи се със запазена структура и липса на микроскопски артефакти. Измерванията на нервните клетки, бяха проведени върху тези от тях, при които се визуализира клетъчното ядро, което бе прието като белег, че тъканният срез е преминал приблизително през геометричния център на клетката. С цел получаване на съизмерими и достоверни резултати строго бяха спазвани въведените критерии, стандартизиращи проведените измервания.

За по-голяма яснота регистрираните стойности на изследваните показатели представихме в табличен вид. За графично представяне на получените данни използвахме диаграми от типа „кутия с мустачки“ (англ. Box-and-Whisker Plot или Box Plot). Данните са анализирани с помощта на тест на *Kruskal-Wallis*, който е непараметрична алтернатива на еднофакторния дисперсионен анализ за съпоставка на три и повече групи (извадки). Тестът на *Kruskal-Wallis* използва

Таблица 2. Полуколичествена оценка на експресията на невроактивни вещества в КРО на плъх.

Невроактивно вещество	Миентерични ганглии		Мускулна обвивка	
	Невронални тела	Нервни влакна	ЦМП	НМП
Ацетилхолин	+	–	+	–
Субстанция Р	–	+	+/–	–
Азотен оксид	+	+	+	–
АТФ	–	+/–	+	+

Означения: +, позитивна реакция; +/-, реакцията е област-специфична; –, негативна реакция.

ранговете на наблюденията като се сравняват средноаритметичните стойности на ранговете за всяка група.

Проследени по хода на дебелото черво на плъха бяха следните показатели:

- Площ на миентералните неврони (μm^2) в отделните сегменти, при различна ориентация на среза през чревната стена;
- Интензитет на имунореактивност на миентералните неврони в отделните сегменти при специфичните имунохистохимични реакции (сива скала, 0 – 255).

5.1. Площ на миентеричните неврони в отделните сегменти на КРО

Сравнителният анализ на площта на миентеричните неврони показва известни различия както по отношение на стойностите в отделните сегменти на КРО, така и относно различните ориентации на срезите.

Тестът на *Kruskal-Wallis* не показа статистически значими различия в площта на миентералните неврони в четирите изследвани групи на напречните срези, $H(3) = 3.422$, $p = 0.3310$, и при надлъжните срези $H(3) = 2.706$, $p = 0.4393$, и при тангенциалните срези $H(3) = 2.280$, $p = 0.5164$.

Сравнението на стойностите на медианите на площта в отделните сегменти показва по-големи размери в колона спрямо аноректалната област (табл. 3-5). Прави впечатление, че това е валидно при всички видове срезове: напречни, надлъжни и тангенциални (фиг. 16-18).

При сравнението на стойностите за един и същ сегмент, но с различна ориентация на среза е видно, че стойностите са най-ниски при надлъжните срези (табл. 4, фиг. 17), средни по стойност са при напречните (табл. 3, фиг. 16) и най-високи са при тангенциалните срезове (табл. 5, фиг. 18).

5.2. Интензитет на имунореактивност на миентералните неврони в отделните сегменти на КРО

Сравнителният анализ на имунореактивността на миентералните неврони показа статистически значими различия в отделните сегменти на дебелото черво на плъха при повечето от проведените оцветявания. За по-голяма яснота, измерените стойности са представени в таблици 6-10.

Сравнението на имунореактивността на холинергичните неврони показа статистически значими различия по хода на КРО. Тестът на *Kruskal-Wallis* показа статистически значими разлики в интензитета на оцветяване на телата на невроните в изследваните части на колона, $H(3) = 16.79$, $p = 0.0008$. Тестът на *Dunn* показа значими разлики в интензитета при проксималния и дисталния колон, $p < 0.05$ (фиг. 19).

По отношение на имунореактивността към SP, тестът на *Kruskal-Wallis* показа статистически значими разлики в медианите на изследваните групи: проксимален колон, Mdn = 38.312, дистален колон, Mdn = 19.201, ректум, Mdn = 19.156 и анален канал, Mdn = 51.015; $H(3) = 17.28$, $p = 0.0006$. Тестът на *Dunn* показа значими разлики в интензитета на оцветяване на SP-имунопозитивните нервни влакна между проксимален и дистален колон ($p < 0.05$), проксимален колон и ректум ($p < 0.05$), дистален колон и анален канал ($p < 0.05$), и ректум и анален канал, $p < 0.01$ (фиг. 20).

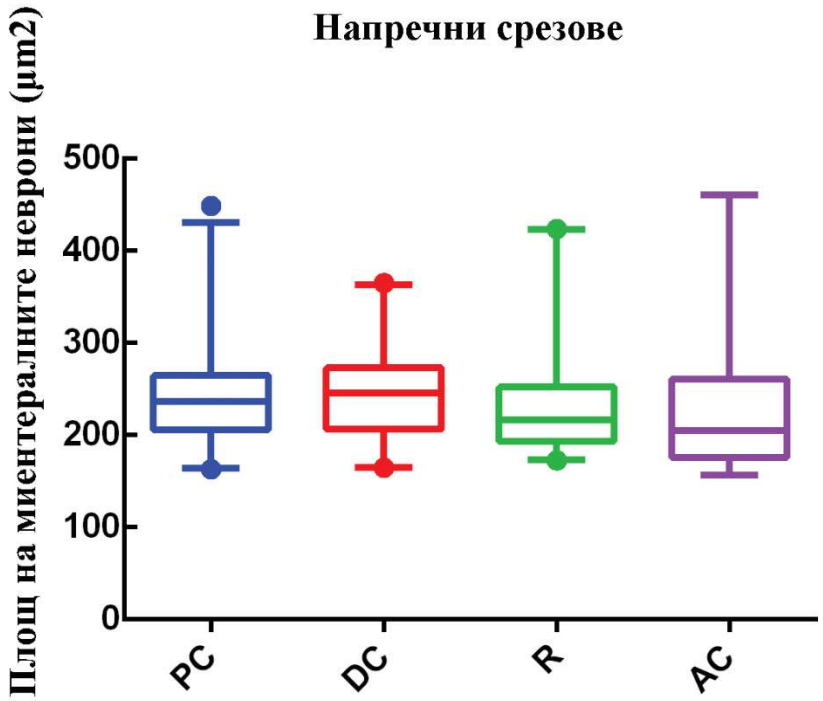
Оценката на имунореактивността за АТФ с тестът на *Kruskal-Wallis* не показа статистически значими разлики в медианите при четирите изследвани групи, $H(3) = 5.495$, $p = 0.1389$ (фиг. 21).

При интензитета на оцветяване на NADPH-d-позитивните структури медианите на проксималния колон (Mdn = 152.737), дисталния колон (Mdn = 132.959), ректума (Mdn = 105.331) и аналния канал (Mdn = 72.640) показват статистически значими разлики, $H(3) = 105.239$, $p < 0.0001$ (фиг. 22). Тестът на *Dunn* разкри разлики в интензитета на оцветяването на невроналните тела между проксималния колон и ректума ($p < 0.001$), проксималния колон и аналния канал ($p < 0.001$), дисталния колон и ректума ($p < 0.05$), дисталния колон и аналния канал ($p < 0.001$), и ректума и аналния канал, $p < 0.01$ (фиг. 22).

При nNOS-имунопозитивните структури, тестът на *Kruskal-Wallis* не показа статистически значими разлики при експресията на nNOS в четирите изследвани групи, $H(3) = 2.455$, $p = 0.4835$ (фиг. 23).

Таблица 3. Количествени характеристики на площта на миентералните неврони в μm² при напречни срезове в КРО на плъх.

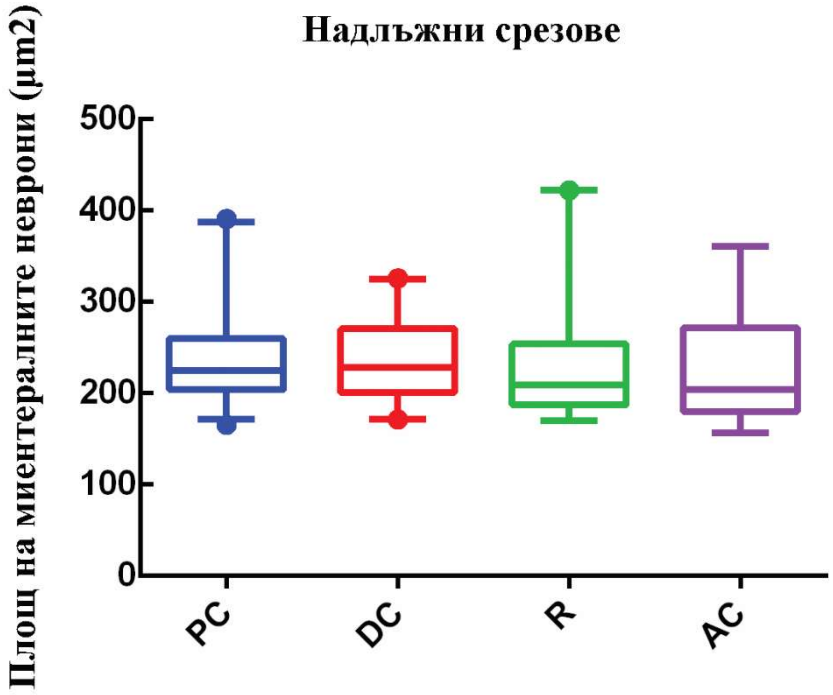
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	251,189	236,286	76,467	13,961
DC	248,302	245,900	52,107	11,652
R	237,100	216,527	67,417	14,373
AC	237,404	204,752	88,019	20,193



Фигура 16. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между площта на миентералните неврони при напречни срезове по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност.. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 4. Количествени характеристики на площта на миентералните неврони в μm² при надлъжни срезове в КРО на плъх.

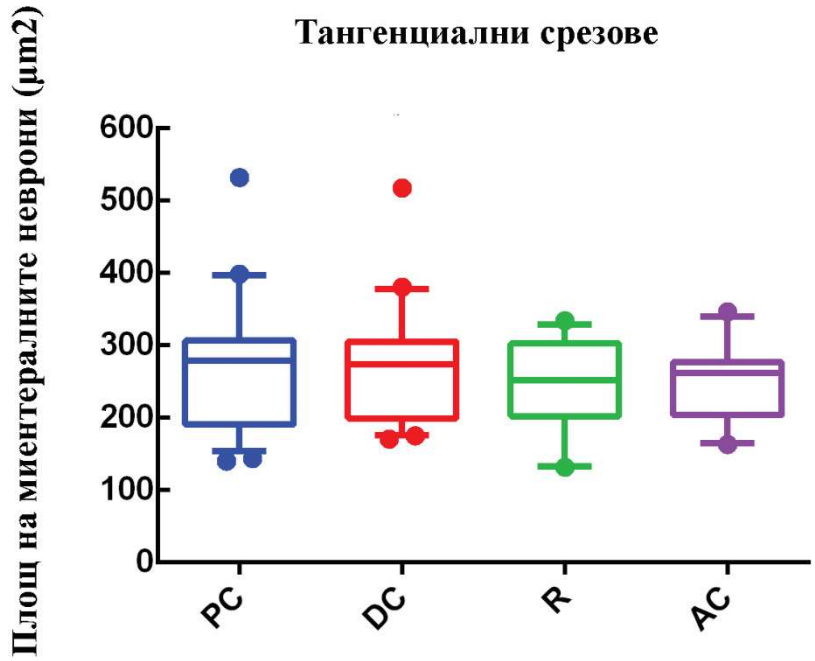
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	241,310	224,767	56,322	11,497
DC	236,262	228,306	46,035	10,046
R	227,540	209,298	59,386	13,624
AC	229,105	203,990	64,487	15,200



Фигура 17. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между площта на миентералните неврони при надлъжни срезове по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност.. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 5. Количествени характеристики на площта на миентералните неврони в μm² при тангенциални срезове в КРО на плъх.

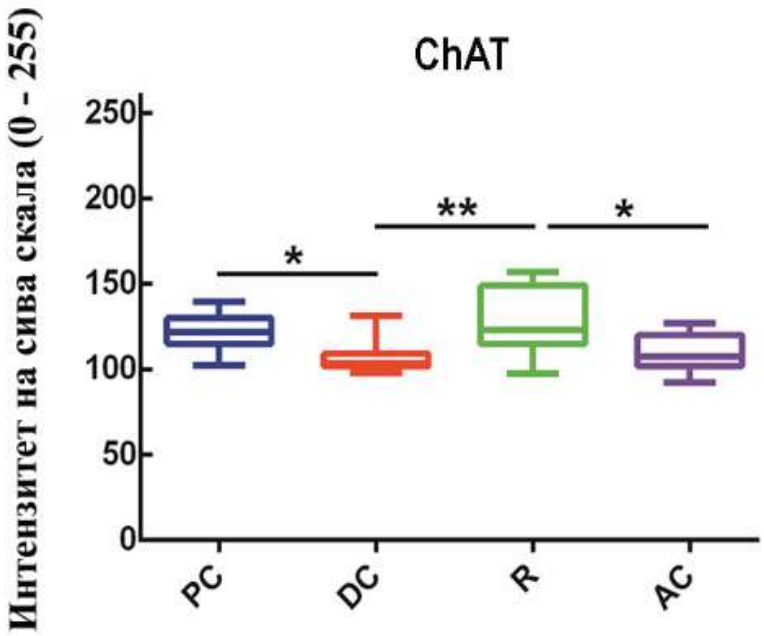
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	270,379	278,845	76,691	11,307
DC	269,420	273,599	71,818	11,082
R	249,803	252,221	58,787	11,757
AC	249,745	261,518	48,238	10,284



Фигура 18. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическо сравнение между площта на миентералните неврони при тангенциални срезове по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност.. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 6. Количествени характеристики на интензитета на имунореактивност на холинергичните неврони по хода на КРО на плъх.

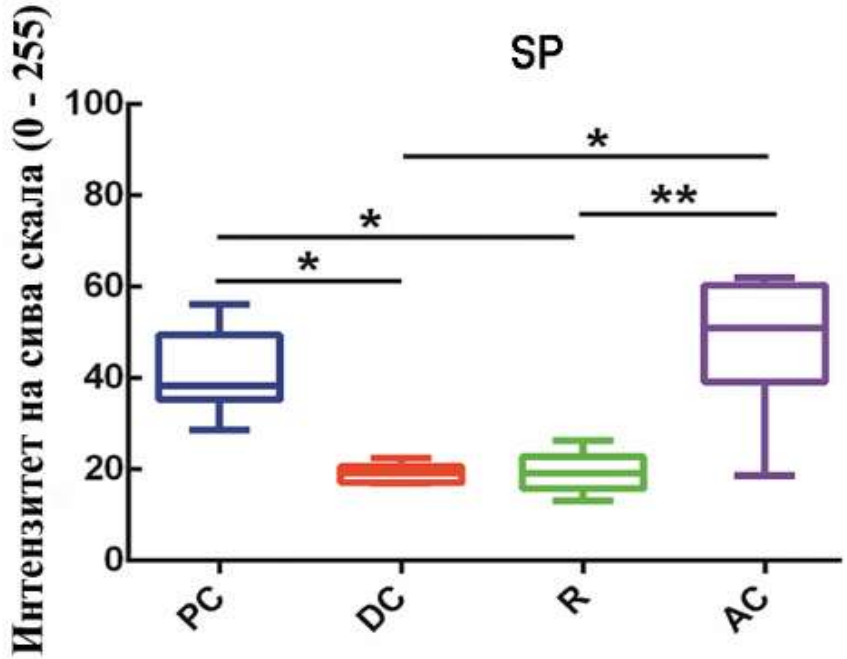
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	122,390	121,567	10,517	2,917
DC	106,785	103,449	8,882	2,463
R	127,703	123,092	19,563	5,426
AC	109,098	107,281	10,203	2,830



*Фигура 19. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на имунореактивност на холинергичните неврони по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. Началото и краят на хоризонталните линии показват сравняваните при теста на Kruskal-Wallis двойки групи; *p<0.05, **p<0.01. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.*

Таблица 7. Количествени характеристики на интензитета на имунореактивност на нервните структури към SP по хода на КРО на плъх.

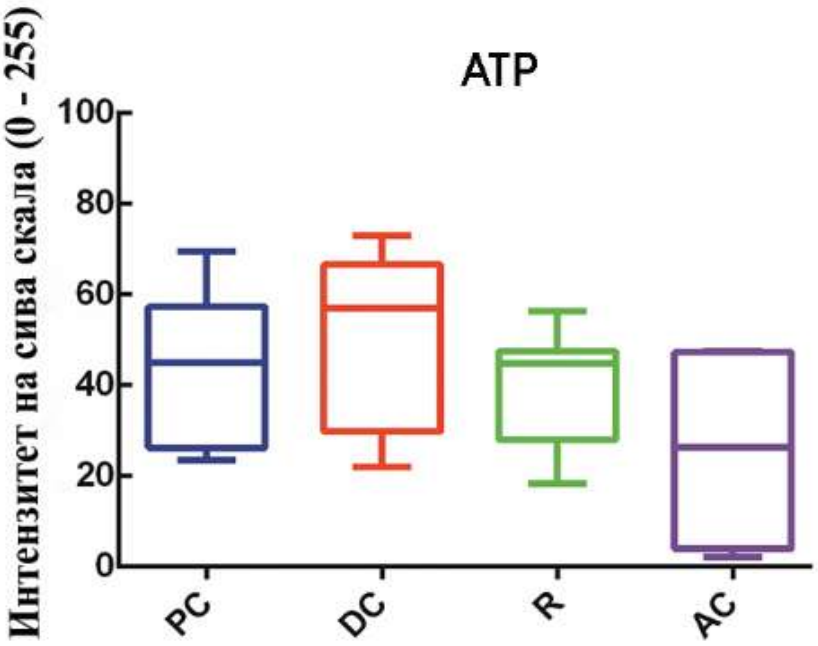
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	41,085	38,312	9,161	3,462
DC	19,258	19,201	2,133	0,806
R	19,369	19,156	4,364	1,649
AC	46,793	51,015	15,019	5,677



*Фигура 20. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на имунореактивност на нервните структури към SP по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. Началото и краят на хоризонталните линии показват сравняваните при теста на Kruskal-Wallis двойки групи; *p<0.05, **p<0.01. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.*

Таблица 8. Количествени характеристики на интензитета на АТФ имунореактивност на нервните структури по хода на КРО на плъх.

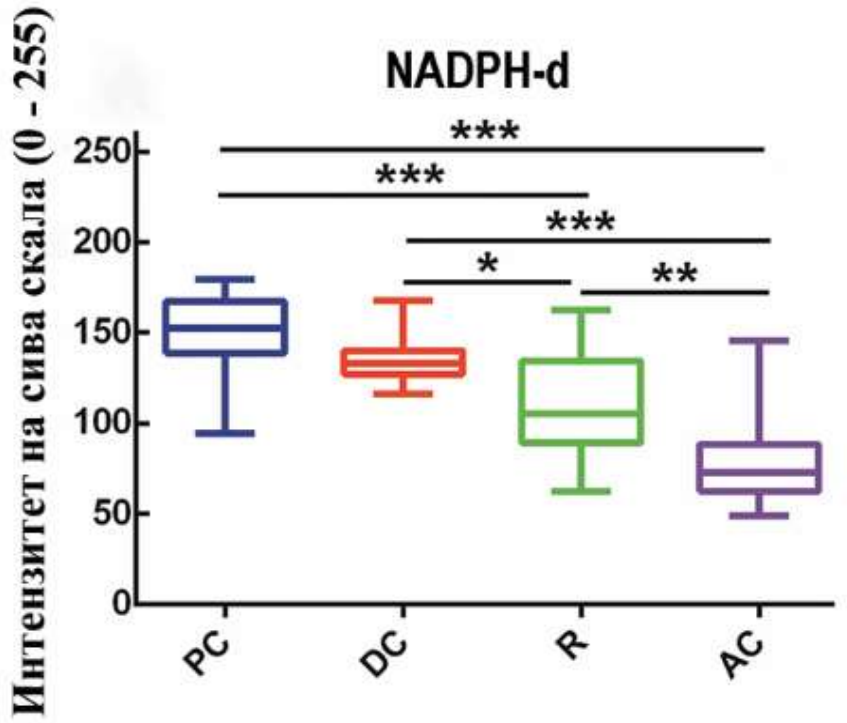
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	44,821	45,032	17,219	6,508
DC	50,779	57,056	18,951	7,163
R	39,764	44,764	12,956	4,897
AC	24,674	26,335	20,713	7,829



Фигура 21. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на имунореактивност на ннервните структури към АТФ по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 9. Количествени характеристики на интензитета на оцветяване на нитрергичните нервни структури по хода на КРО на плъх

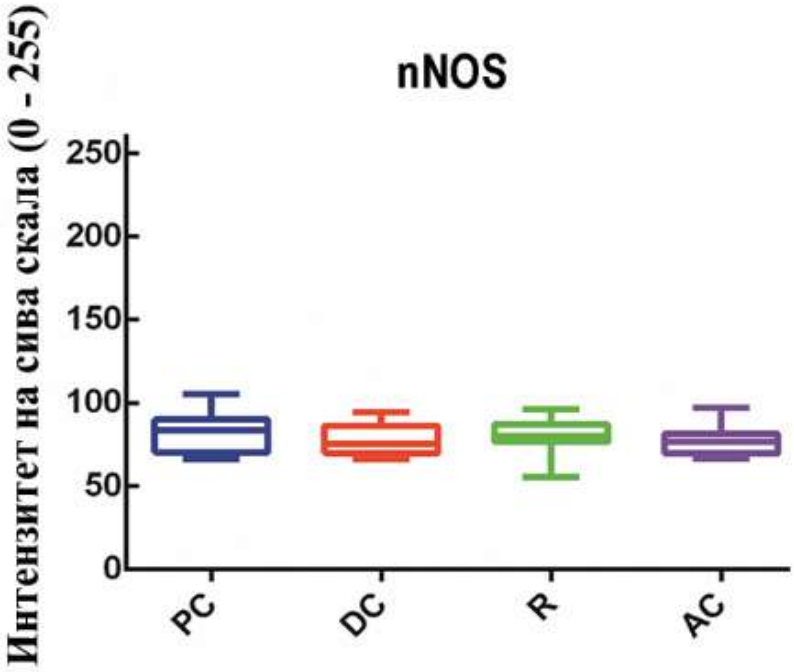
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	150,703	152,737	18,595	2,421
DC	136,814	132,959	14,462	2,783
R	110,897	105,331	28,684	4,653
AC	77,979	72,640	20,355	3,069



*Фигура 22. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на оцветяване на нитрергичните нервни структури по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. Началото и краят на хоризонталните линии показват сравняваните при теста на Kruskal-Wallis двойки групи; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.*

Таблица 10. Количествени характеристики на имунореактивност на нервните структури към nNOS по хода на КРО на плъх.

	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	82,262	83,476	12,108	3,651
DC	78,179	75,365	9,479	2,629
R	81,332	80,055	9,252	2,244
AC	77,463	76,604	9,589	3,390



Фигура 23. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на имунореактивност на нервните структури към nNOS по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квартил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

V. ОБСЪЖДАНЕ

Една от най-забележителните особености на ЕНС е изумително сложната мрежовидна система от връзки между нервни клетки, имащи най-разнообразна морфологична и функционална принадлежност. Благодарение на своето комплексно устройство тя не просто успява да изпълнява разнообразните си функции, но и постига една неприсъща за нито една друга телесна система автономия по отношение на регулация от страна на централната нервна система (ЦНС). Аспектите на структурната и функционалната ѝ организация са толкова многобройни и разностранни, че дори поставената в тесни граници в това проучване експериментална дейност и нейния комплексен анализ представляват истинско предизвикателство за изследователя и изключват и най-беглите претенции за изчерпателност.

В резюмиран вид, постигането на целите на настоящето изследване ще оценим чрез дискусия и анализ на получените резултати в следните основни направления:

1. Да изясним фундаменталните морфологични характеристики на МС и да сравним нашите находки с наличните в литературата данни.
2. Да обсъдим ролята на установените в нашето изследване невромедиатори на миентералните неврони и да съпоставим собствените ни резултати с натрупаните познания за ентералните трансмитерните системи.
3. Да анализираме направените наблюдения върху различните системи нервни влакна и интерпретираме тяхната роля в дисталния отдел на ГИТ.
4. Да направим статистическите анализ на получените нови данни относно регионалните особености на трансмитерната експресия в отделните части на КРО и да направим генерално заключение за тяхното топографско разпределение и потенциална функционална роля в дисталния интестинален тракт.

1. Морфологична организация на МС

При анализа на резултатите установяваме, че подготовката на материала, вкл. отпрепариране на тъканта е от най-съществено значение за последващата визуализация на ганглиите и съставните им неврони. Съществуват два основни метода за обработка на чревната стена за изследване на ЕНС – на *wholemount* препарати и на тъканни срезове. Изготвянето на *wholemount* препарати с цел изследване на ентералните плексуси включва използване на дисекционен стереомикроскоп и ултрафин инструментариум, с помощта на които се отделят

лигавичния и подлигавичния слоеве. Тази техника налага понякога и междинно отстраняване на вътрешната част на ЦМП. *Wholemount* методиката е широко практикувана, но високоспециализирана дейност, която се прилага със затруднения дори при едрите животни и човека, имащи по-значителна дебелина на чревната стена. Извънредната тънкост на стената на ГИТ на гризачите, включително плъха, затруднява този процес допълнително. По тази причина, като най-широко разпространен метод за дидактични цели и в диагностичната практика остават тъканните срезове, които използваме и ние.

В началото, на обсъждане подлежат морфологичните характеристики на МГ с оглед на различна ориентация на тъканните срезове спрямо оста на червото. В конкретния случай за изследване се използват три разновидности тъканни срезове: напречни, надлъжни и тангенциални срезове. При първите два типа, плоскостта на среза преминава под относително прав ъгъл през мускулните подслоеве и разположения между тях МС. При тангенциалните срезове, в зависимост от това на каква дълбочина в червото е направен среза, той преминава в по-голяма или по-малка степен успоредно на плоскостта на мускула и плексуса. Както установихме в хода на нашите експерименти, това оказва съществено влияние върху начина, по който се визуализират ганглиите и съставните им части.

В този смисъл следва да обсъдим постигнатите резултати в три основни насоки:

- ✓ общи структурни особености на МГ;
- ✓ морфология на наблюдаваните в тях неврони;
- ✓ наличие на нервни структури в мускулните подслоеве.

1.1. Морфология на МГ

В първата серия от проведените от нас опити ние използваме конвенционални методи за изследване на невроморфологията на МГ на срезове през чревната стена. Параметрите, които се взимат предвид при анализа на морфологията на нервни ганглии, най-често включват размери, форма, морфологична обособеност като напр. наличие или липса на капсула, клетъчна плътност, нумерично съотношение между нервни и глиални клетки. Работата с тъканни срезове би предоставила непълни или подвеждащи данни при някои от тези параметри, затова ние фокусираме нашето обсъждане върху конкретна част от тях.

С оглед външната морфология и, по-конкретно интерпретацията на формата на изследваните структури, е важно да се уточни че на тъканните срезове наблюдаваме двуизмерно изображение, а не реалната триизмерна форма на ганглиите. Би било погрешно на базата на данни само от една пространствена

проекция да се правят изводи за формата с оглед на факта, че е невъзможно да се определи през коя част от ганглия е преминал среза. С оглед на това, дори при сравнителен анализ на размерите в две перпендикулярни проекции, има значителен риск от получаване на подвеждащи данни. Доколкото триизмерната форма на ганглиите е била изследвана на *wholemount* препарати (Furness и Costa 1980; Maifrino и съавт. 2008), данните сочат за неправилна, но генерално издължена форма на целия ганглий, ориентирана перпендикулярно на оста на червото.

Формата на обследваните от нас МГ не показва съществени различия в отделните сегменти на КРО. При всички напречни и надлъжни срезове, тя е силно издължена и с изтънени краища, т.е. изглежда че ганглиите са приплеснати между двата мускулни подслоя. Видима разлика, която би могла да се изтъкне при визуалното сравнение между индивидуални ганглии, е тяхната дебелина. Вертикалният размер при най-малките ганглии съответства на дебелината на един неврон и съседна глиална клетка, докато при други се наблюдават няколко реда нервни и глиални клетки. Това не променя генералната овална форма на ганглиите, а само техните пропорции, т.е. съотношението между напречния и вертикалния им размер. Подобни разлики във вертикалния размер наблюдаваме във всички отдели на КРО и не отчитаме преобладаване на определен тип в специфичен сегмент. На основата на тези наблюдения можем да направим заключението, че дебелината на МГ е вариабилна, както в отделните части на червото, така и в пределите на един и същ сегмент. В това отношение, нашите находки напълно съвпадат с налични данни от литературата (Gabella 1981a; Gabella и Trigg 1984)

На много места в нашите резултати се натъкваме на твърде неправилна форма на МГ, най-често триъгълна или полигонална, със заострени краища. Прави впечатление че този изглед се наблюдава само при тангенциалните срезове. При съпоставянето на данните от всички видове срезове е възможно да изградим цялостна представа за триизмерната структура на ганглиите. От факта че при напречните и надлъжните срезове централната им част е най-дебела, а в краищата те изтъняват, можем да направим извода че по-голямата им дебелина в центъра на ганглия се дължи на интерганглионерните връзки, започващи от периферията им и свързващи ги едни с други. Тангенциалните срезове преминават приблизително или напълно успоредно на равнината на МС. Фактът, че при тях формата най-често е неправилна навежда на мисълта че ганглиите имат звездовидна форма, чийто лъчи продължават като интерганглионерни връзки. Не можем да очакваме плоскостният срез да е преминал през всички тези „израстъци“, но от наблюдаваните на препаратите форми можем поне да съдим за минималната им бройка и тя варира от три до четири. Фотомикрографските

снимки на *wholemount* препарати от КРО на мишка и морско свинче (Messenger и Furness 1990; Maifrino и съавт. 2008) показват напълно аналогични структури, т.е. нашите резултати не откриват съществени отклонения от принципното устройство на МС в КРО при плъха.

По отношение на граничната област на МГ, данните от литературата посочват, че те са некапсулирани образувания, които са прикрепени директно към съединителната тъкан, пронизваща мускулните подслоеве (Yamamoto 1977; Komuro и съавт. 1982). Нещо повече, изследванията включващи морфометрични измервания при отпусната и разтегната чревна стена показват, че този фактор влияе на морфометричните показатели, т.е. механичните сили приложени върху чревната стена директно се предават на ганглийните клетки (Gabella и Trigg 1984). Всичко това показва, че МГ се различават коренно от ганглиите на автономната нервна система. Резултатите ни от рутинното оцветяване с ХЕ разкриват че наистина не съществува обособена съединителнотъканна капсула, която най-вероятно би се визуализирала като еозинофилен слой от влакнеста тъкан с определена дебелина. Вместо това, ганглиите имаха вид на обособена клетъчна маса, разположена в тясно цепковидно пространство между двата мускулни подслоя. Наблюдаваните от нас клетки, с трудно отличими контури и малки хетерохромни ядра в граничната зона между ганглии и мускулен слой, е много вероятно да са фибробластоподобните клетки, които са описани при електронномикроскопски изследвания (Gabella 1972a). Освен тях, единственото друго което се открива в тази гранична зона е описаното по-рано малко количество рехава тъкан. Много често нервните клетки се откриват в привидно директен контакт с мускулните подслоеве. Това не е изненадващо, като се имат предвид съобщенията, че дори ентералната глия оставя оголени обширни части от невроните и техните израстъци (Komuro и съавт. 1982), т.е. нашите находки напълно потвърждават наличните в литературата данни.

Със задоволителна информативност по темата са и други наши собствени резултати, получени с конвенционални методики, и по-конкретно със сребърната импрегнация по *Gomori*. Тази техника е насочена основно към локализирането на ретикуларни съединителнотъканни влакна. Въпреки популярността и широката й употреба, ние не открихме в литературата данни от подобно изследване в областта на ЕНС. Резултатите от нашето проучване отново потвърждават тезата за директната физическа връзка между МГ и *tunica muscularis*. Фини снопчета от ретикуларни влакна са нормална находка в екстрацелуларния матрикс на гладкия мускул (George и Johnson 2012). Както е видно от резултатите ни, тези снопчета директно се сливат с тънкия слой от аналогична тъкан, ограждащ по-голямата част от МГ. Той от своя страна продължава в граничната зона между мускулните подслоеве. От една страна,

този факт може да се разглежда като потвърждение на гореописаните данни. От друга страна обаче, ретикуларният слой около ганглиите е осезаемо по-дебел и по-ясно отграничен от всички околни ретикуларни натрупвания. Въпреки че подобно на предишни изследвания ние също не открихме данни за наличие на съединителнотъканна капсула, това натрупване би могло да представлява своеобразна ганглийна базална ламина. Ние смятаме, че това допускане може да служи като добра отправна точка за бъдещи изследвания в областта.

1.2. **Морфология на миентералните неврони**

Настоящото изследване има подчертано морфологичен характер, невключващо функционални методи на изследване, който биха позволили детайлното морфофункционално класифициране на наблюдаваните неврони. Въпреки това е възможно с известни условности да бъдат направени изводи за морфологията им, която от своя страна често е свързана с ясно дефинирани функции.

От литературния обзор стана ясно, че най-голям процент от миентералните неврони на морското свинче попадат в две морфологични групи неврони – *Dogiel* тип 1 и 2 (Furness 2000). Ако приемем по асоциация сходни морфологични характеристики за наблюдаваните от нас неврони в дисталната чревна стена на плъх, то можем да очакваме мнозинството от регистрираните неврони да показват същите два типа структура. Макар и твърде опростено, перикарионите на невроните с морфология *Dogiel* тип 1 са подобни по форма на типичните за ЦНС мултиполарни неврони, т.е. контурите им са звездовидни (Furness и съавт. 1989). Обратно, телата на *Dogiel* тип 2 са по-окръглени и с по-изгладени контури (Hendriks и съавт. 1990). Те също имат започващи от тялото израстъци, които не променят в голяма степен кръглата или овална форма на перикариона, особено като се има предвид визуалното ограничение на присъщите за светлинната микроскопия увеличения. Логично е да се заключи, че тяхната форма ще бъде аналогична не само при напречните и надлъжните срезове, но също и при тангенциалните такива. Според наличните данни за морското свинче (Hanani 1998), телата на миентералните неврони са приплеснати в равнината между двата мускулни слоя и дендритите им се разклоняват предимно в същата равнина. С други думи, срезната плоскост както на напречните, така и на надлъжните срезове не би следвало да преминава през широкия, а по-скоро през тесния профил на тези приплеснати перикариони. Това поставя допълнителни ограничения върху методиката и лимитира получените данни с нея.

В нашите резултати, ние не отчитаме съществени разлики в наблюдаваната форма на невроналните тела при напречните и надлъжните срезове. Една основна група от тях са с леко издължена форма, но с отчетливи зачатъци на израстъци в стесняващите се краища. Другата голяма група от неврони бяха

окръглени и с гладки контури. Забелязва се отчетливото сходство със споменатите по-горе големи групи неврони. С оглед на невъзможността на срезни препарати да се направи достоверна морфологична класификация на клетките, ние предпочитаме да говорим за клетки с полигонална или окръглена форма.

На изготвените от нас тангенциалните срезове в една или друга степен присъствието на тези два клетъчни типа става по-осезаемо. Така например, при хистохимичното оцветяване за NADPH-d регистрираме почти изцяло невронални профили със звездовидна форма и множество израстъци. Това е в съответствие с данните от морското свинче, където видяхме, че нитрергичните неврони са моторни неврони и интерневрони, които са предимно с морфология тип 1 и 3, т.е. те са с подчертано полигонална форма. От друга страна при имунохистохимичното оцветяване за ChAT и SP откриваме значително повече невронални тела (или техните очертания) с окръглени контури. Това също е в пълно съответствие с презумпцията, че сетивните неврони с морфология тип 2 са холин- и тахикининергични. Като обобщение можем да приемем, че въпреки ограниченията, резултатите от изследванията при плъх, проведени на срезове, да направим генерално заключение за напълно потвърждават данните от литературата.

При анализа на резултатите от морфометричното изследване на невроните също успяхме да направим някои изводи за невроналната морфологията и за специфични различия в отделните сегменти на дебелото черво на плъха. Въпреки че сравнителните тестове не отчетоха статистически значими отклонения, прави впечатление че регистрираните размери на миентералните неврони все пак показват определени различия. Така например, средните стойности на площта на невроните в областта на колона са осезаемо по-високи от тези в ректума и аналния канал. Такива резултати са аналогични с данните от предишни изследвания (Gabella и Trigg 1984; Santer и Baker 1988). Това е важно и от гледна точка на клетъчната форма. При съпоставяне на данните за размерите на невроните от един и същ сегмент, но при различна ориентация на срезовете, забелязваме че във всички изследвани сегменти средните стойности на площта са по-малки при надлъжните срезове спрямо напречните. Макар че подобен метод на сравнение има своите ограничения, би могло да се допусне, че миентералните неврони са леко издължени и че дългият им профил е успореден на оста на циркулярните гладкомускулни влакна. Ако към това прибавим и данните от невроналната площ при тангенциалните срезове забелязваме, че стойностите са осезаемо по-високи от тези при двете предишни групи. Отново с известна нотка на предположение може да се направи извода, че невроните са приплеснати в равнината между ЦМП и НМП. Въпреки че са ориентировъчни,

тези изводи напълно потвърждават данните от литературата (Hanani и съавт. 1998, Furness 2000).

1.3. **Нервни структури в мускулните подслоеве**

Една от основните функции на МС е регулация на чревния мотилитет чрез пряка инервация на намиращата се около него гладка мускулатура (Bennett 1997). Поради това ще направим кратък анализ и на наличните нервни елементи в нея. Поради неспецифичните си оцветителни характеристики, нервните влакна не могат да бъдат ефективно визуализирани при конвенционалните методики. Като изключение от това можем да разглеждаме сребърната импрегнация по *Golgi*, която контрастно откроява нервните структури. Последното е напълно валидно и за специфичните хисто- и имунохистохимични методики, прилагани от нас. Отликата между тях е че за разлика от последните две, импрегнационният метод е неселективен към различните трансмитерни системи. С това предварително уточнение, трябва да отбележим, че различните оцветителни методи демонстрират сходни хистологични резултати. Независимо от тяхната дебелина, влакнестите снопове в ЦМП са винаги успоредни на гладкомускулните влакна, както са описани и от Heinicke и Kiernan (1990). За отклонения от този принцип може да става дума само по отношение на различните ориентации на среза през ЦМП, т.е. в случаите, в които той преминава през него напречно, влакнестите снопове също са прерязани напречно и имат окръглен вид, следователно ходът на мускулните влакна е отново успореден. В допълнение, в част от наблюдаваните хистологични препарати ние регистрирахме наличие на характерни варикозитети, които са анализирани по-долу.

При някои имунохистохимични реакции, например тази за доказване на ChAT, се визуализират осезаемо повече нервни елементи в съседство с вътрешната граница на ЦМП като в някои области сноповете са с по-голяма дебелина, а в други те са разположени по-нагъсто. Най-вероятно тези находки са аналог на описания от други автори субмускуларен или дълбок мускулен плексус (Gabella 1974).

Инервацията на НМП е обект на дългогодишен научен интерес и обсъждане. Класическите схващания са, че в моторната му инервация най-силно е застъпено действието на т.нар. третичен плексус, който е подразделение на МС (Richardson 1958). Той представлява мрежа от фини нервни снопчета, разположена по вътрешната повърхност на НМП. Друго широко застъпено схващане е, че характеристиките на инервацията на НМП са в пряка зависимост от неговата дебелина (McConalogue и Furness 1994). В животинските видове, при които той се открива като извънредно тънък слой, не са открити снопчета от нервни влакна, които да го прекосяват. Това на практика означава, че той се инервира изцяло от

третичния плексус. Такъв е случая с цялата обиколка на НМП при морското свинче (McConalogue и Furness 1993), както и при участъците, разположени между надлъжните ленти на този мускулен слой (тении) при човека (Hanani и съавт. 2012). Обратно, в тениите както и при животните с повсеместно удебелен НМП са налични снопчета влакна пронизващи слоя и ориентирани успоредно на гладкомускулните влакна. Изхождайки от тези данни, не би следвало в НМП на КРО при плъха да се открият прекосяващи го нервни структури.

Като потвърждение на гореописаното, при почти всички използвани от нас специфични методики, ние не откриваме влакнести снопчета от какъвто и да било порядък. За сметка на това относително често наблюдаваме реактивно оцветяване по вътрешната повърхност на НМП, за което е логично да се предположи че се дължи на третичния плексус. Като изключение от това внушение можем да посочим само имунохистохимичните реакции за АТР и SP. По отношение на последната, реактивни влакна се установяват само в аноректалната, а при тази за АТФ те се наблюдават по хода на цялата КРО. Можем да заключим, че е възможно описаните находки да са свързани със специфични особености на моторната инервация, осъществена от тези трансмисионни системи.

2. Неврохимичен профил на МС

Както отбелязахме в началото на раздела, ЕНС включва в себе си неврони, влизащи в сложни взаимовръзки помежду си и използващи една изключително широка гама от невротрансмитери и модулатори. В литературния ни обзор е описано, че натрупаните познания в областта са резултат от стотици мултидисциплинарни изследвания, започнали през деветнадесети век. Категорично невъзможно е в рамките на един научен труд с ограничени цели да бъде постигнат пълен обхват при обследването на неврохимичния профил на системата. По тази причина, в нашия труд ние се спираме върху конкретни трансмитерни системи след внимателен анализ на текущата концепция за химичната кодировка на функционално обособените групи неврони. Водещият принцип за обобщение е да генерираме данни за репрезентативни представители на основните групи от контрансмитери, които да бъдат специфични за кодировката на съответната група.

На базата на това, както и като предпоставка за качествено сравнение, ще обсъдим наличните данни за установената преди холинергичната трансмисия в ГИТ, макар и тя да не е част от NANC системата.

2.1. Холинергична система в МС

Ацетилхолинът е трансмитер, присъщ за почти всички функционално обособени групи неврони на МС на морското свинче (Brookes и съавт. 1991). Като изключение на това могат да се посочат единствено задръжните мотоневрони за двата мускулни подслоя (Furness 2000). За да проучим наличието и локализацията на тези неврони в дебелото черво, ние използвахме имунохистохимична методика за демонстриране на характерния за тях ензим холин ацетилтрансфераза, ChAT (Furness и съавт. 1983). Резултатите от нашето изследване убедително потвърждават презумпцията, че установените преди данни в други животински видове се отнасят и за плъх, за който в литературата данните са ограничени. Тази методика ни предостави едни от най-интензивно оцветените цялостно МГ, които ние многократно регистрирахме в хода на експериментите, свързани с това проучване. Това несъмнено се дължи на широкото разпространение и високата численост на холинергични неврони в ганглиите, като последното се отнася и до техните интраганглионерни влакна.

В сравнение с други системи нервни клетки, наблюдаваните от нас тела на холинергични неврони показват силна имунореактивност. С известни ограничения, това направи сравнително лесно наблюдението и описанието на специфичните особености на клетъчната им форма. Съгласно Furness (2006), в МС на морското свинче преобладава невронална морфология първи тип на *Dogiel*, а единствено собствените първични аферентни неврони и част от низходящите интерневрони показват морфология от съответно втори и трети тип. С други думи, напълно очаквано е преобладаващата форма на наблюдаваните холинергични неврони да бъде неправилна или звездовидна, каквато находка отчитаме и ние. Можем да заключим, че нашите резултати потвърждават презумпцията, че холинергичните неврони са добре обособена невронална популация в КРО на плъха.

2.2. NANC система в МС

Сложната нервна регулация на интестиналната гладка мускулатура включва възбудна и инхибиторна система от неврони, намиращи се основно в миентеричния и отчасти в субмукозния сплит (Ставрева-Маринова 2012; Burnstock и съавт. 1972; Bauer и съавт. 1982). До шейсетте години на двадесети век е било наложено схващането, че всички компоненти на автономната нервна система функционират на базата на холинергична и адренергична нервна трансмисия. В продължение на последните близо пет десетилетия, са описани нови, разнообразни по химична структура и механизъм на действие трансмитерни системи, обединени под името неадренергична, нехолинергична (NANC) система. Поради голямата численост на трансмитерите, обединени в

тази система, би било крайно непрактично индивидуалните медиатори да бъдат анализирани поотделно. По тази причина те се класифицират или на базата на химичната си структура, или на базата на функционалната принадлежност на невроните, които ги експресират. Разбира се, от морфологична гледна точка най-удачна за употреба е първата. Като следствие се оформят три големи групи трансмитери: пептиди, пурини и газове (азотен оксид), характеризиращи три съответни групи неврони: пептидергични, пуринергични и нитрергични.

2.2.1. **Пептидергична трансмисия в МС**

Поради най-широката си разпространеност сред миентералните неврони, тахикинините, и по-конкретно най-известният представител на това пептидно семейство субстанция Р (SP), беше изследван от нас като репрезентативен трансмитерен пептид от тази група. Според Furness (2000), преобладаващата част от разгледаните по-горе холинергични неврони имат за котрансмитер именно SP. Единствените изключения от това правило са низходящите интерневрони и интестинофугалните неврони. Тези изключения, обаче, съставляват не повече от 10% от всички миентерални неврони.

Ролята на SP в осъществяването на рефлексите на ентералната моторика е обект на редица изследвания при различни животински модели и в различни отдели на ГИТ. Смята се, например, че SP-съдържащи миентерални неврони в тънкото черво на плъха медиират собствените за червата моторни и секретомоторни рефлекси, индуцирани от физиологични и патофизиологични стимули (Turvill и съавт. 2000; Larsson и съавт. 2008). По-конкретно, потвърдено е, че SP-медиираната трансмисия участва в три невронални регулаторни системи.

При първата, SP е котрансмитер на възбудните миентерални мотоневрони, заедно с ацетилхолин (Llewellin-Smith и съавт. 1988; Brookes и съавт. 1991). Въпреки това, функционалното значение на тези два трансмитера, измерено чрез способността им да индуцират съкращение на чревната мускулатура, не е еднакво. Доказано е, че блокирането на холинергичната трансмисия води до по-тежка дисфункция, отколкото блокирането на тахикининергичната трансмисия, т.е. SP има второстепенна роля във възбудната моторна система (Holzer и Holzer-Petsche 1997). Втората система е тази, включваща възходящите (с орални проекции) интерневрони, при които SP е котрансмитер заедно с ацетилхолин и калретинин (Lomax и Furness 2000). Функционалното значение на тези неврони е в осъществяването на пропулсивни чревни рефлекси. Третата система се асоциира със сетивния елемент от рефлексните дъги и включва СПАН, които по своето същество са първичните сетивни неврони на ЕНС. При тях SP е

котрансмитер, заедно с ацетилхолин и калбиндин (Furness 2000; Lomax и Furness 2000; Mazzuoli и съавт. 2007).

В направения литературен преглед прави впечатление, че фокусът на изследванията до момента, независимо от използвания животински модел, е върху тънкото черво. Резултатите от нашето изследване сочат, че SP-ергичната трансмисия е съществен компонент от ЕНС и в по-дисталните отдели на ГИТ. Погледнато най-общо, всички изследвани от нас сегменти показаха изразена имунореактивност към SP, както в самия МС, така и в ЦМП.

Установената от нас липса на значително оцветяване на перикарионите е описана и при други изследвания (Ivancheva и съавт. 1998; Lazarov и съавт. 2009). От друга страна, оцветяване е било наблюдавано при други експерименти (Costa и съавт. 1981; Hens и съавт. 2002). Едно от възможните обяснения на този феномен е предположението, че задържането на антитела в цитоплазмата е подпомогнато чрез блокиране с колхицин на аксоналния ток в изследвания материал (Heinicke и Kiernan 1990).

На базата на собствените ни резултати, би било спекулативно да се правят заключения за морфологичната принадлежност на невроните, образуващи варикозно-разширените имунореактивни влакна, както и за тези с които те образуват синапси в ганглиите. Въпреки това трябва да се подчертае, че резултатите ни не са в противоречие със скорошни публикации, доказващи че подобни варикозно-разширени SP-имунопозитивни влакна правят синапси по клетъчната повърхност на тялото на неврони, експресиращи неврокинин 1-рецептори (основен клетъчен рецептор за тахикинини), но в същото време са SP-негативни (Polidoro и съавт. 2017). Същото е докладвано и в други публикации, доказващи че миентералните SP-имунореактивни неврони морфологично принадлежат към описаните *Dogiel* тип 1 (мотоневрони и интерневрони) или тип 2 (Mitsui 2011).

При сравнение на нашите резултати с тези от подобни изследвания на колона на морското свинче (Pataky и съавт. 1990) прави впечатление сходството на находките. Въз основа на това, би могло да се направи предположението, че наблюдаваните от нас миентерални имунореактивни влакна също са от собствен за чревната стена произход, както е при морското свинче.

Наличието на SP-имунореактивни снопчета влакна в ЦМП е в съответствие с изследвания, правени върху редица животински модели (Bennett 1997; Mitsui 2011). Находките открити в НМП обаче не са толкова еднозначни. В червото на свинята например се наблюдава пълна липса на имунореактивни влакна в този слой (Gonkowski 2013), докато при плъха и морското свинче не само че такива са описани, а допълнително е установено, че те имат значително

влияние върху възбудната моторна трансмисия (Bauer 1993). В този труд ние установихме такива данни само в дисталните отдели на КРО.

2.2.2. **Пуринергична трансмисия в МС**

Съществуват експериментални данни, че пуринергичната трансмисия играе роля при релаксацията на ЦМП и НМП по целия ход на ГИТ (Ren и Bertrand 2008). В колона при плъх е установено, че при инхибиторните мотоневрони има пълна колокализация на АТФ и NO, докато в аноректалната област това е валидно само за част от пуринергичните неврони (Belai и Burnstock 1994). Въпреки че Furness (2006) представя данни за участие на пуринергичната трансмисия при низходящи миентерални интерневрони, АТФ остава в литературата като основен представител на NANC трансмитерите, свързани с мускулната релаксация, заедно с NO и VIP.

Пуринергичните структури в нашето изследване са представени основно от снопове влакна, разположени в периферията на МГ, а също и в интерганглионерните връзки и в двата мускулни подслоя. Последното е интересна находка, тъй като повечето от останалите наблюдавани от нас имунореактивни влакна са концентрирани в ЦМП, а в НМП те почти не се откриват.

На изследваните препарати, АТФ-имунопозитивни невронални тела се установяват само в единични ганглии в дебелото черво. Въпреки това, системата от имунореактивни нервни влакна недвусмислено има вид на собствена, т.е. принадлежаща на чревната стена. Въпреки наличието на позитивни влакна в субсерозния слой, те бяха в пренебрежимо малко количество спрямо тези в областта между мускулните подслоеве или в самите тях. Нещо повече, в ЦМП последните съставят забележимо по-дебели влакнести снопове в близост с МС, които в посока към подлигавичния слой изглеждаше че прогресивно изтъняват. С други думи, находките сочат, че произходът на тези влакна при плъха е от МС, а не от външни за ЕНС автономни нерви.

2.2.3. **Нитрергична трансмисия в МС**

Съществуват три общоприети изоформи на ензима азотен оксид синтаза, синтезиращ медиатора NO (Alderton 2001). Присъщата за невроните невронална изоформа (nNOS) показва колокализация в съответните неврони с ензима NADPH-d (Dawson и съавт. 1991; Hope и съавт. 1991). По тази причина, приемаме че получените резултати от изследванията ни с хистохимичната реакция за NADPH-d и имунохистохимичната реакция за nNOS се отнасят до една и съща невронална полулация.

В литературата недвусмислено е потвърдено наличието на нитрергични неврони в ЕНС и по-специално в МС на морското свинче (Furness и съавт. 1994), куче (Ward и съавт. 1992), свиня (Barbiers и съавт. 1993) и други животински видове. Счита се че нитрергичните миентерални неврони са основно звено в низходящите задръжни моторни рефлекси в червата, тъй като nNOS е локализирана в инхибиторните неврони на ЦМП и НМП, в низходящите интерневрони и интестинофугалните неврони (Furness 2006). Налични са също данни за разпространението им в други отдели на ГИТ на плъха като например в дуоденума (Bodi и съавт. 2009).

Анализирайки резултатите от нашето изследване, категорично можем да потвърдим наличието на стабилна популация от нитрергични неврони във всички отдели на КРО на плъха. МГ показват интензивна реактивност и при двете използвани методики. Като забележима разлика в резултатите от тях може да се изтъкне степента на оцветяване в ганглиите като цяло. При хистохимичните реакции открояващо се очертават телата на NADPH-d-имунопозитивните неврони, тъй като в околното пространство най-често се открива фина мрежа от варикозни нервни влакна. Последните са многобройни, но съвкупността им поражда бледо оцветяване. Това прави нитрергичните неврони контрастни и лесно достъпни за качествен анализ. Обратно, при имунохистохимичните реакции за nNOS, свободните от неврони пространства в ганглиите най-често също показват интензивно оцветяване, понякога хомогенно, понякога с фибрилерен вид. Интензитетът му е по-нисък в сравнение с този на невроните, но е осезаемо по-висок от този при същите структури след провеждане на хистохимичните реакции. Това прави морфологичния анализ на нитрергичните неврони при имунохистохимичното изследване по-труден.

По отношение на клетъчната форма на тези неврони, в литературата съществуват противоречиви данни. Въз основа на функционалната си принадлежност, нитрергичните неврони би трябвало да попадат в групата на първи тип по *Dogiel* (Brehmer 1999a). Описвани са и такива с морфология от *Dogiel* втори тип (Nichols и съавт. 1992). Понастоящем се предполага, че последните са неправилно определени като такива, единствено въз основа на методични и технически причини. Във всички изследвани ганглии и във всички отдели на КРО на плъха, нашите резултати говорят за присъствие само на една нитрергична клетъчна популация – такава, отговаряща по характеристики на *Dogiel* тип 1 неврони. И наистина, всички регистрирани невронални тела бяха с неправилна, звездовидна форма, дължаща се на множество заострени цитоплазмени израстъци.

3. Специфични особености на нервните влакна, произлизащи от МС

Съвсем осезаемо при разглеждане на хистологичните препарати е наличието на варикозитети по хода на различните системи от влакна. Определено с най-големи размери и гъстота са тези при SP-ергичните влакна. При други трансмитерни системи варикозитетите са по-слабо развити, а при трети почти не се установяват. За наличие на варикозитети по хода на SP-ергичните влакна се съобщава и в други научни разработки (Llewellyn-Smith и съавт 1989; Adelson и съавт. 2009). От тях е видно още, че инжектирането на SP води до промени в дендритите на невроните, експресиращи неврокинин-1 рецептора, който се приема за основния клетъчен рецептор за SP. Установено е, че интернализирането на рецептора след еднократна (Mantyh и съавт. 1995) или продължителна (Marvizon и съавт. 1998) апликация на SP довежда до образуването на множество варикозитети по хода на тези неврони. Предполага се, че образуването на варикозитети може да има последствия за невроналните функции, тъй като то е съпътствано от редукция в диаметъра на областите между тях, а това драстично променя геометрията на дендритите (McNeil и съавт. 1999). Ето защо съществуват теории, че варикозитетите могат да бъдат средство за ограничена инхибиция на импулсния поток, редуциране на проводимостта на нервните влакна и изолиране на перикарионите от възбудни или задръжни въздействия (Ellias и Stevens 1980). На базата на приложените методики, ние не можем да съдим за функционалната значимост на тези варикозитети, но смятаме че е необходимо задълбочено проучване на евентуалното влияние на тези структури върху ентералната моторика.

По-слабо развити, но определено налични, бяха варикозитетите по хода на пуринергичните и нитрергичните влакна. Причините за наличието на варикозитети при АТФ-позитивните нервни влакна могат да бъдат свързани с натрупването на АТФ в големи количества в синаптичните везикули (Larsson и съавт. 2012). Предполага се че АТФ и NO се откриват съвместно застъпени в една и съща популация от неврони (Belai и Burnstock 1994). Връщаме се на този факт, тъй като би могло да бъде открита причинно-следствена връзка между находките от варикозните влакна. В исторически план, АТФ е бил първият описан NANC трансмитер (Burnstock и съавт. 1972). През следващите десетилетия са натрупани доказателства за присъствието на АТФ в синаптичните везикули, за освобождаването му от тях, редом с други утвърдени невротрансмитери и за екстрацелуларния му метаболизъм (Bennett 1997; Burnstock и съавт. 2010). Въз основа на тях, АТФ е бил определен като основен пуринов невротрансмитер в червата. Въпреки това, съществуват данни че и други пуринови производни, например никотинамид-аденин-динуклеотид-

фосфат ($NADP^+$), също изпълняват тези функции, при това именно в ЕНС (Mutafova-Yambolieva и съавт. 2007; Hwang и съавт. 2011). Действително в нашите резултати варикозните нервни влакна бяха добре оформена находка при хистохимичната реакция за NADPH-d, но не и при имунохистохимията за nNOS, а тези реакции би следвало да позитивират една и съща невронална популация. По тези причини, не е изключено наблюдаваното във варикозитетите високо съдържание на ензими, свързани с нуклеотидния метаболизъм, да се обяснява с функцията на $NADP^+$ като котрансмитер на АТФ в инхибиторните мотоневрони. Въпреки постиженията на науката в областта на NANC трансмисията, към днешна дата се откриват много пропуски във взаимообвързаността на пуринергичната и нитрергичната трансмисия и механизмите им на действие. По тази причина считаме нашите резултати за добра отправна точка за бъдещи изследвания в тази посока.

4. Регионални особености на NANC системата в КРО

Хистохимичните и имунохистохимичните реакции остават основно средство за изследване и анализ на специфичната невронална трансмисия във всички части на соматичната и автономната нервна система, в това число и ЕНС. Те дават пълноценна информация както за количествените, така и за качествените характеристики на различните невронални системи. Наред с основните морфометрични показатели на невроните, изследователите обръщат специално внимание и на интензитета на оцветяване.

Както е видно от обзора и от собствените ни резултати, холинергичните и NANC невроните са постоянна и добре развита клетъчна популация в ЕНС на бозайниците в здраво състояние на червата. Не така обаче стоят нещата при редица патологични състояния на ГИТ, при който могат да се наблюдават значими отклонения в количеството или активността на отделни невронални групи. Удачни примери за това са аганглионозата на *Hirschprung* (Hanani и съавт. 1995), хипертрофичната пилорна стеноза (Vanderwinden и съавт. 1992), ахалазията на вътрешния анален сфинктер (Hirakawa и съавт. 1995) и други, при които се наблюдават сериозни отклонения в характеристиките на нитрергичната трансмисия например. Това подсказва, че недостатъчност на гореспоменатите трансмитерни системи може да е директно свързана с патофизиологията на тези социално значими заболявания. Оттам изхожда и необходимостта да бъдат натрупани максимално много научни данни за неврохимично обособените групи неврони.

Специфичните хистохимични и имунохистохимични методики притежават общ недостатък. Силно оцветените и неоцветените неврони могат да бъдат лесно оценени количествено като позитивни или негативни. Не така обаче

стоят нещата със средно- и слабо оцветените неврони, които не могат дефинитивно да бъдат определени като позитивни или негативни такива. Освен визуалната преценка, която носи в себе си определено ниво на субективизъм, не ни е известно да съществува стандартизиран метод за определяне на праговите стойности. По тази причини, дори с ясната перспектива че съществува риск за редуциране големината на изследваната популация, в нашите статистически анализи ние включихме само клетките с недвусмислена позитивна реакция. Като заключение, отново излиза на преден план необходимостта от широкообхватни качествени изследвания в областта.

Сравнения на интензитета на оцветяване на специфични групи неврони в даден сегмент от ГИТ са представени от много автори (Timmermans и съавт. 1994; Maifrino и съавт. 2008; Yang 2013). Въпреки това, не открихме в литературата сравнение на средния интензитет на оцветяване на холинергичните и NANC невроните по хода на КРО на плъха, поради което намираме нашите резултати за ценни за сравнителен топографски анализ на трансмитерната експресия в ГИТ.

Преди да обсъдим резултатите, свързани с невроналната трансмисия, най-напред е редно да направим някои уточнения, свързани със самите методики, тъй като те имат пряко практическо значение. Използваната от нас имунохистохимична реакция за ChAT понастоящем е основният избор на методика при изследването на холинергични неврони. В близкото минало най-широко е бил използван друг метод, а именно хистохимичната реакция за разграждащия трансмитера ензим ацетилхолинестераза (Meier-Ruge и Bruder 2008). Проблемът изхожда от това, че този ензим не е специфичен за холинергичните неврони, а се открива и в нехолинергични такива. Понастоящем се налага мнението, че имунохистохимията за ChAT е най-надеждния метод за идентификация и анализ на тези неврони (Zoli 2000). Собствените ни резултати отчитат, че има статистически значими различия в експресията на ChAT по хода на КРО, като по-висока тя е в проксималния отдел на колона и в ректума.

При изследването на нитрергичната трансмисия е важно да се вземат предвид някои особености, започващи още с тъканната обработка. Първото емпирично хистохимично изследване за активност на ензима NADPH-d при невроните е това на Scherer-Singler и съавт. (1983), които експериментират с различни условия на инкубация на тъканта. Като оптимална времева продължителност на инкубационното време на мозъчна тъкан те определят 30 минути. Kuo и съавт. (1994) съобщават, че увеличаването на инкубационното време при работа в ЦНС наистина не увеличава броя на позитивните неврони, но пък увеличава интензитета на оцветяването им. С други суми, произволните промени в параметрите на методиката не биха били от значение за

количествения анализ на невроналната експресия, но за сметка на това биха имали сериозно влияние върху резултатите от качествено естество. По тази причина е необходимо да се наблегне на факта, че уеднаквяването на условията на подготовка на тъканния материал за ензимохистохимично изследване от отделните сегменти от червото е от първостепенна важност за адекватен сравнителен анализ. При изготвянето на нашите препарати, ние стриктно следяхме за точното придържане към предложените от Scherer-Singler (1983) стойности, т.е. 30 минути инкубационно време.

От наличните данни в литературата, вариациите в степента на експресия, размерите и формата на клетките предполагат съществуването на функционални подгрупи от нитрергични неврони. Най-голямата субпопулация от тях е тази на инхибиторните мотоневрони, предизвикваща релаксация на ентералната гладка мускулатура (Vanden-Berghe 1999). Остатъкът от тях е много вероятно да изпълняват функции на инхибиторни интерневрони и дори да са включени в сетивната рецепция от ЦМП (Cserni 2009). Cracco и Filogamo (1994) съобщават, че различията в интензитета на оцветяване може да са свързани със разлики в количественото съдържание на NADPH-d, активността на ензима или с локални специфики на изоензимните пропорции. Макар и хипотетично, според Cserni (2009) по-силна експресия е най-вероятно да имат именно инхибиторните нитрергични мотоневрони, а по-слабата да е присъща за останалите изброени функционални подгрупи. Вероятно е тези зависимости да могат да бъдат приложени и по отношение на експресията на АТФ, който е котрансмитер на NO в същите популации от неврони (Belai и Burnstock 1994). От всичко изброено може повторно да се направи извода, че прогресът в експериментите, свързани с нервната експресия в ЕНС е определящ за развитието както на невроморфологията, така и на патофизиологията и терапията на ентералната патология.

Собствените ни резултатите, свързани с нитрергичната трансмисия отчитат известно противоречие. Качественият сравнителен анализ на резултатите от хистохимичните реакции за NADPH-d показва статистически различия по хода на КРО. По-конкретно, интензитетът на оцветяване е значително по-висок в аноректалната област, отколкото в колона, като той е най-висок в аналния канал, а най-нисък – в проксималния колон. Считаме за напълно вероятно това да е обусловено от специфични особености на регулацията на моторните рефлекси в тези области. Сравнителният анализ на данните от имунохистохимичната реакция за nNOS обаче не показва наличие на значими разлики в експресията.

Възможни са няколко предполагаеми причини за това. Първата от тях е тези два типа реакции да позитивират поне частично различни популации от клетки, т.е. да няма пълна колокализация между NADPH-d и nNOS. Ние намираме тази

възможност за малко вероятна, поради неоспоримите данни за пълна колокализация (Dawson и съавт. 1991; Hope и съавт. 1991). Вярваме че макар и да е статистически възможно, не е била налице техническа грешка или лабораторна неизправност, която би довела до фалшиво позитивно или негативно оцветяване. Другата, и според нас най-вероятна възможност, е свързана със спецификата на статистическите методи. Съвкупността от тъканни срезове, които успяхме да изготвим за хистохимичните реакции, числено превъзхожда тези за имунохистохимия. Следователно анализираната статистическа популация количествено беше осезаемо по-голяма при реакцията за NADPH-d, което неминуемо е предпоставка за по-точно изследване. Аналогично на това, съществува известен риск, данните получени за nNOS, да не са напълно представителни за цялата популация.

Резултатите от експресията на АТФ не показаха статистически значими разлики по хода на КРО. Поради значително по-широкия набор от хистологични препарати, които успяхме да изготвим за това изследване и следователно по-голямата изследвана площ, не смятаме за вероятно статистическия анализ да е предоставил подвеждащи данни. Същото се отнася и за резултатите касаещи SP-ергичната трансмисия, където се наблюдават слаби регионално-специфични различия. Общото между тези две изследвания е че и при двете, с малки изключения, не се наблюдава имунореактивност в клетъчните тела, т.е. морфологичният субстрат за статистическия анализ е реактивността на варикозните нервни влакна. Видно е от резултатите, че тахикининергичната трансмисия е най-интензивна в проксималния колон и аналния канал, а най-ниска – в дисталния колон.

5. Бъдещи насоки и перспективи

ЕНС е изумителен комплекс от нервни клетки, изпълняващ функциите си прецизно и осъществяващ регулацията си почти автономно. Настоящият научен труд е малка, но и уверена стъпка към пълното опознаване на нейните морфологични и неврохимични характеристики. Без съмнение, неизяснените понастоящем особености все още остават много и въпреки донякъде обезкуражаващото си въздействие, налагат продължаваща и методична бъдеща изследователска дейност за тяхното по-нататъшно изясняване.

В контекста на гореизложеното, нашите бъдещи научни намерения ще бъдат насочени в следните насоки:

- Да проучим в детайли ултраструктурата на ганглиите и по-конкретно да изясним специфичните взаимоотношения между миентералните неврони, ентералната глия и гладкомускулните клетки.

- Да изследваме на ултрамикроскопско ниво спецификата на граничната област на ганглиите и функционалното ѝ приложение.
- Да проучим в по-големи детайли причинно-следствените връзки за образуването или не на варикозни нервни влакна и функционалното значение на регионалните им различия.
- Да разширим обхвата на изследваните в този труд трансмитерни системи, със запазен фокус върху област-специфичните им особености.
- Да приложим проведените специфични методи на изследване в контекста на ентерално патологичен модел.
- Да проучим дали конвенционални хистологични методи на изследване като сребърната импрегнация по *Golgi* предоставят адекватни резултати при прилагането им върху патологично увреден орган като напр. при аганглионозата на *Hirschprung*.

VI. ИЗВОДИ

1. Работата с тъканни срезове носи сравнително ограничена, но достоверна морфологична информация относно устройството на МГ и съставните им неврони.
2. МС при плъха има мрежовидна структура, състояща се от ганглии и интерганглионерни връзки, свързващи ги помежду им.
3. МГ на плъха не разполагат с добре оформена съединителнотъканна капсула. Вместо това, те са обвити от тънък слой съединителнотъканни влакна, които са пряко производно на съединителната тъкан, пронизваща околните мускулни подслоеве.
4. Наличието и общото количество нервни структури в МС може да бъде ефективно установено с помощта на конвенционални хистологични методи на изследване като сребърната импрегнация по *Golgi*.
5. Миентералните неврони у плъх отговарят по морфологични черти на техните аналози, описани при други животински видове.
6. Въпреки установените стойности, няма статистически значими разлики в усреднените размери на миентералните неврони по хода на КРО на плъха.
7. Миентералните неврони в дисталния интестинален тракт използват широк спектър от ентерални трансмитери, включително класически медиатори като ацетилхолин и NANC трансмитери като невропептида субстанция Р, пуриновия посредник АТФ и газовата молекула азотен оксид.
8. Нитререргичните и пептидергичните миентерални неврони показват статистически значими област-специфични разлики в трансмитерната си експресия по хода на дебелото черво на плъха.
9. Пептидергичните, пуринергични и нитрергични влакна, произхождащи от МС образуват добре изразени варикозитети.
10. НМП на дебелото черво у плъх се прекосява от пептидергични и пуринергични варикозни влакна с вътрешен произход от МС.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални приноси

1. Натрупани са оригинални данни за клетъчните размери на миентералните неврони в КРО на плъх и тяхната морфологична типизация.
2. Уточнен е неврохимичният профил на невроните от МС в колона и аноректалната област на дебелото черво у плъх.
3. За пръв път е осъществено комплексно изследване на неадренергичната, нехолинергична трансмитерна система в КРО на плъх.
4. Направен е сравнителен топографски анализ на разпределението на установените NANC трансмитери по хода на дебелото черво при плъх.
5. Установен е повишен интензитет на имунооцветяване на нитрергични нервни структури в аноректалната област и наличие на SP- и АТФ-съдържащи варикозни нервни влакна в НМП на дебелото черво на плъх.

Потвърдителни приноси

1. МС в КРО на плъха показва сходно устройство с аналога му при други животински видове.
2. Потвърдена е пространствената организация и външен изглед на МГ при различна плоскостна ориентация на изследваните срезове от чревната стена.
3. МГ са некапсуловани образувания, обвити от тънък слой от ретикуларни влакна.
4. Приведени са имунохистохимични доказателства че наред с основния възбуден трансмитер в червата, ацетилхолин, миентералните неврони в коло-ректалната област на плъха експресират и други невропептидни медиатори (субстанция Р), пурини (АТФ) и газови невропосредници (азотен оксид).

VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Kirov T**, Atanasova D, Malinova L, Jelev L, Lazarov N (2019). Morphological characteristics and cytoarchitecture of the myenteric ganglia in the rat proximal colon. *Acta Morphologica et Anthropologica*. 26(3–4):34-37.

2. **Kirov T**, Atanasova D, Malinova L, Jelev L, Lazarov N (2019). Histochemical localization of NADPH-diaphorase reactive neurons in the colorectal region of the rat. *Acta Morphologica et Anthropologica*. 26(3–4):3-6.

3. **Kirov T**, Malinova L, Atanasova D, Lazarov N (2020). Localization of substance P-immunoreactive nerve structures in the rat colon. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, in press.

(IF – 0.329)

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Kirov T**, Atanasova D, Malinova L, Jelev L, Lazarov N. Localization of NADPH-diaphorase-positive neurons in the myenteric plexus of recto-anal region in the rat. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Stara Zagora, Bulgaria (May 31 – June 02, 2019). Abstracts, p. 19.

2. **Kirov T**, Atanasova D, Malinova L, Lazarov N. Substance P-immunoreactive nerve fibers in the myenteric plexus of the rat recto-anal region. XI International Symposium on Clinical Anatomy, Varna, Bulgaria (October 2 – October 4, 2020). Abstracts, p. 8.

3. **Kirov T**, Malinova L, Atanasova D, Lazarov N. A simple method for localization of neuronal structures in the rat colonic wall. XXV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with International Participation, Pleven, Bulgaria (May 28 – 30 May 2021). Abstracts, p. 12.

X. SUMMARY

The enteric nervous system (ENS) exerts local control on the gastrointestinal motility, exocrine and endocrine secretions, local blood flow, and modulates the immune and inflammatory processes in the gut. One of its two principal components, the myenteric plexus is closely involved in the reflex regulation of contractile activities of the surrounding intestinal musculature. As opposed to the classical paradigm, that the major transmitters of such autonomic neurons are acetylcholine (ACh) and noradrenaline there has been no convincing evidence that noradrenaline plays any role in the intrinsic neurotransmission of the ENS. Consequently, over time the non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) transmission system, comprising the entirety of other transmitters, was proved much more diverse and complex.

The current knowledge on the intestinal part of the myenteric plexus is primarily based upon gastrointestinal research on the small intestine of the guinea pigs as models for humans. However, rodents such as the rat are the most commonly used species for biomedical research because they are very similar to humans genetically. Therefore, the aim of this study was to investigate the morphology of the myenteric plexus and describe the neurochemical coding of adult rat myenteric neurons in the large intestine with a special emphasis on NANC transmitters.

The general morphology, cytoarchitecture and morphometric properties of the myenteric plexus in the rat colorectal region appeared to mimic its equivalent in the more proximal parts of the rat digestive tract and in other experimental animals.

The main neuroactive substances involved in the NANC transmission are nitric oxide (NO), tachykinins, mostly substance P (SP) and adenosine triphosphate (ATP), co-localized in variable proportions with other neuroactive substances. After applying NADPH-diaphorase enzyme histochemistry and nNOS immunohistochemistry, we were able to demonstrate numerous nitrergic somata of myenteric neurons with Dogiel type I morphology. In addition to the observed nitrergic distributional patterns, significant variations were registered in the staining intensity of myenteric structures in the colon and anorectal area. Tachykinins and more precisely their major representative SP formed an abundance of intensely stained varicose SP-immunopositive fibers, ensheathing the immunonegative myenteric neuronal cell bodies in a basket-like manner. ATPergic structures were mostly limited to fiber bundles surrounding unstained myenteric neurons and penetrating the two muscle layers. A notable finding was the notable presence of reactive nerve fiber bundles in the longitudinal muscle layer.

Our results suggest that myenteric neurons in the distal intestinal portion utilize a broad spectrum of enteric transmitters, including classical and NANC transmitters.

БЕЛЕЖКИ