

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
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**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“
в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт,
професионално направление 7.1. Медицина,
научна специалност: Анатомия, хистология и цитология

Научен ръководител: Проф. д-р Лина Малинова, дм

Научен консултант: Проф. д-р Николай Лазаров, дм, дмн

София, 2022 г.

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 се отразил в мен.

Трудно е да поставя в думи благодарността си за незаменимата помощ на **доц. Димитринка Атанасова**, от която с лекота мога да кажа, че съм възприел по-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 взимам професионален пример и в чието лице винаги съм намирал помощ, когато е била нужна.

Огромна признателност 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:

Съдържание:

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	8
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	10
1. Ентерална нервна система.....	10
1.1. Общ преглед.....	10
1.2. Субмукозен сплит.....	12
1.3. Субсерозен сплит.....	15
2. Миентеричен сплит.....	15
2.1. Общо устройство на миентеричния сплит.....	15
2.2. Структура на миентеричните ганглии.....	17
2.3. Невронални структури в мускулния слой на чревната стена.....	19
2.3.1. Надлъжен мускулен слой.....	19
2.3.2. Циркулярен мускулен слой.....	19
2.4. Връзки с околните сплитове.....	21
2.5. Морфологична класификация на невроните на миентеричния сплит.....	21
2.5.1. Dogiel тип 1 неврони.....	23
2.5.2. Dogiel тип 2 неврони.....	24
2.5.3. Dogiel тип 3 неврони.....	28
2.5.4. Неврони тип 4, 5, 6 и 7.....	29
2.6. Функционална класификация на невроните на миентеричния сплит.....	30
2.6.1. Мотоневрони.....	30
2.6.1.1. Мотоневрони за циркулярния мускулен подслой	33
2.6.1.2. Мотоневрони за надлъжния мускулен подслой	34
2.6.2. Интерневрони.....	34
2.6.3. Собствени първични аферентни неврони.....	36

Съдържание:

2.6.4. Интестинофугални неврони.....	38
2.7. Ентерална глия.....	38
3. Неврохимична характеристика на миентералните неврони.....	40
3.1. Неадренергична, нехолинергична трансмисия в ентералната нервна система.....	40
3.2. Аденозин трифосфат.....	42
3.3. Тахикинини.....	43
3.4. Вазоактивен интестинален пептид.....	43
3.5. Азотен оксид.....	44
4. Състояние на проблема.....	46
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	47
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	48
1. Експериментални животни.....	48
2. Хистологични техники.....	48
2.1. Рутинни оцветявания.....	48
2.1.1. Вземане и подготовка на материала.....	48
2.1.2. Изготвяне на срезове и депарафиниране.....	50
2.1.3. Оцветяване с хематоксилин и еозин.....	50
2.1.4. Оцветяване по метода на <i>Nissl</i>	51
2.1.5. Сребърна импрегнация по метода на <i>Gomori</i>	52
2.1.6. Оцветяване с толуидиново синьо.....	53
2.2. Сребърна импрегнация по метода на <i>Golgi</i>	53
3. Хистохимична реакция за доказване на NADPH-диафораза.....	54
4. Имунохистохимични методи.....	54
4.1. Методика.....	54
4.2. Специфичност на антителата.....	57
5. Обработка и анализ на изображенията.....	57
6. Сравнителен анализ.....	58
V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ.....	60

Съдържание:

1. Общи съображения.....	60
2. Неспецифични оцветявания.....	60
2.1. Оцветяване с хематоксилин и еозин.....	60
2.2. Оцветяване по <i>Nissl</i>	70
2.3. Сребърна импрегнация по <i>Gomori</i>	73
2.4. Сребърна импрегнация по <i>Golgi</i>	76
2.5. Оцветяване с толуидиново синьо.....	79
3. Хистохимична реакция за визуализиране на NADPH-диафораза.....	82
4. Имунохистохимични реакции.....	90
1.1. Имунохистохимия за холин ацетилтрансфераза.....	90
1.2. Имунохистохимия за субстанция Р.....	93
1.3. Имунохистохимия за невронална изоформа на азотен оксид синтаза.....	101
1.4. Имунохистохимия за аденозин трифосфат синтаза.....	105
2. Сравнителен анализ на миентеричния сплит в отделните сегменти на коло- ректалната област.....	112
5.1. Площ на миентералните неврони в отделните сегменти на коло- ректалната област.....	112
5.2. Интензитет на имунореактивност на миентералните неврони в отделните сегменти на коло-ректалната област.....	113
VI. ОБСЪЖДАНЕ.....	123
1. Морфологична организация на миентеричния сплит.....	123
1.1. Морфология на миентеричните ганглии.....	125
1.2. Морфология на миентералните неврони.....	128
1.3. Нервни структури в мускулните подслоеве.....	130
2. Неврохимичен профил на миентеричния сплит.....	132
2.1. Холинергична система в миентеричния сплит.....	133
2.2. Неадренергична и нехолинергична система в миентеричния сплит....	134
2.2.1. Пептидергична трансмисия в миентеричния сплит.....	134

Съдържание:

2.2.2. Пуринергична трансмисия в миентеричния сплит.....	137
2.2.3. Нитрергична трансмисия в миентеричния сплит.....	137
3. Специфични особености на нервните влакна, произлизащи от миентеричния сплит.....	139
4. Регионални особености на NANC системата в коло-ректалната област.....	141
5. Бъдещи насоки и перспективи.....	145
VII. ИЗВОДИ.....	147
VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	148
IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	149
X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	150
XI. БИБЛИОГРАФИЯ.....	151
XII. SUMMARY.....	175

Въведени съкращения:

Въведени съкращения:

АТФ – аденозин трифосфат

ГИТ – гастроинтестинален тракт

ЕНС – ентерална нервна система

КРО – коло-ректална област

МГ – миентерични ганглии

МС – миентеричен сплит

НМП – надлъжен мускулен подслой

СПАН – собствени първични аферентни неврони

ХЕ – хематоксилин и еозин

ЦМП – циркулярен мускулен подслой

ЦНС – централна нервна система

ChAT – холин ацетилтрансфераза

NADP⁺ – никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат

NADPH – редуцирана форма на NADP⁺

NADPH-d – NADPH-диафораза

NANC – неадренергичен, нехолинергичен

nNOS – невронална изоформа на азотен оксид синтаза

NO – азотен оксид

SP – субстанция P

VIP – вазоактивен интестинален пептид

I. Въведение

Храносмилателната система на бозайниците се характеризира с комплексен набор от морфологични и функционални особености, необходими за нейната дейност. Това е прецизна система от регулиращи механизми, активни както при норма, така и при патология. Основно място в осъществяването на тази комплексна регулация заема описаната през деветнадесети век ентерална нервна система (ЕНС), която е част от автономната инервация на вътрешните органи в стомашно-чревния тракт.

ЕНС се характеризира с комплексно устройство и забележителна автономия при своето функциониране, което дава основание на много автори да я определят като „втори мозък“ на човека. Често срещана изненада при началното запознаване с нейните структурни особености е, че простото на пръв поглед устройство крие в себе си огромно количество специфични морфологични детайли и изтънчени регулаторни механизми. Подобно на главния мозък, ЕНС използва същия инструментариум за осъществяване на своята дейност, включващ мрежа от нервни клетки и техните израстъци, и голям набор от различни невроактивни вещества, наречени невротрансмитери, които опосредстват предаването на информацията между тях.

До днешни дни е натрупано голямо количество информация за общото устройство и функция на ЕНС. Въпреки това, съществена част от откритията за нея имат нееднозначен характер, а друга част се нуждаят от доразвиване. Само чрез детайлното познаване на всички морфологични аспекти на тази комплексна система, би било възможно създаването на нови лечебни методи или лекарствени терапии за патологичните състояния, които засягат гастроинтестиналния тракт (ГИТ) като цяло.

В този смисъл проведеното от нас детайлно проучване с помощта на рутинни и специфични техники на структурните и неврохимични особености на един от двата основни компонента на ЕНС - миентеричния сплит (МС), биха могли да послужат като полезен източник на информация при по-нататъшното изследване на тази обширна област на храносмилателната система с акцент върху изясняване на

Въведение

морфологичния профил и неврохимична принадлежност на ентералните неврони, на физиологичните характеристики и патогенетични механизми, участващи във възникване на възпалителните и неврогенни заболявания на дисталния чревен тракт.

II. Литературен обзор

1. Ентерална нервна система (ЕНС)

1.1. Общ преглед

Още от края на деветнадесети век е известно, че в стената на органите на ГИТ има голямо струпване на нервна тъкан, определено с течение на времето като ЕНС. Първите по-съществени описания на ЕНС датират отпреди около 150 години. Пионери в тези проучвания са немските лекари-изследователи Meissner (1857), Billroth (1858) и Auerbach (1862), които въпреки силно ограничените за времето си възможности на микроскопските техники, успяват да разграничат част от елементите на ЕНС в стените на тръбестите храносмилателни органи.

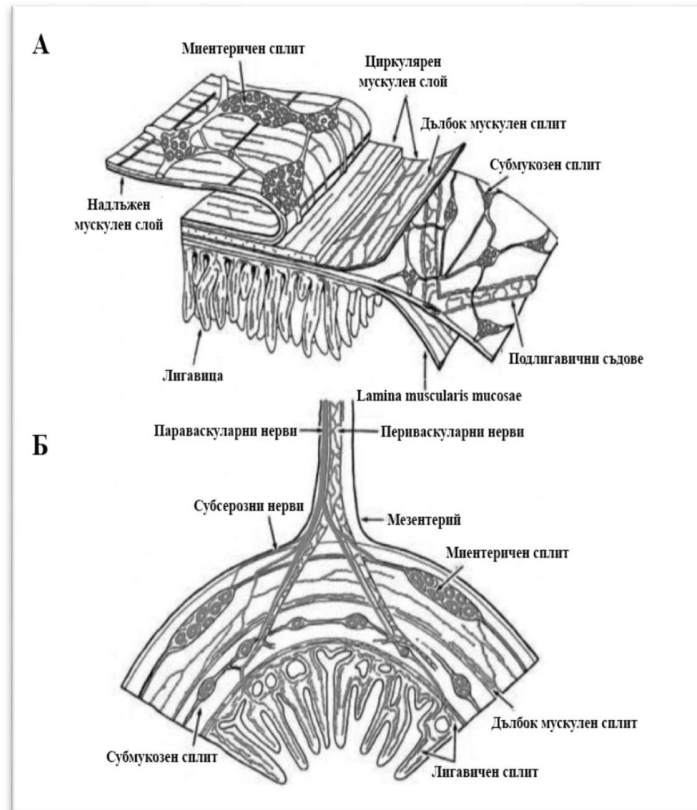
С оглед на изпълняваните от ЕНС функции, може да се генерализира, че тя осъществява инервацията на гладката чревна мускулатура, контролира дейността на лигавичния секреторен епител и кръвоносните съдове на ГИТ, както и на билиарната система и панкреаса. Една от най-характерните особености на ЕНС е, че тя е интегрална част от рефлексни дъги, функциониращи дори без участието на централната нервна система (ЦНС). Подобни сложни рефлексни вериги остават незасегнати след експериментална денервация на червата, което не е присъща черта дори за гръбначния мозък.

ЕНС се състои от телата и израстъците на нервните клетки и поддържащата ги невроглия, разположени по характерен начин в стената на кухите органи на ГИТ, а също така и в жлъчния мехур и, до известна степен, в 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. Отделните ганглии са относително малки по размери, но за сметка на това са толкова многобройни, че цялата система наброява милиони нервни клетки – според някои автори около 100 млн., а според други – значително повече. Прави впечатление, че това са числа напълно съизмерими с класическите

схващания за броя на невроните в гръбначния мозък, което е още едно основание ЕНС да бъде наречена „втори мозък“ в червата.

Важно е да се отбележи, че освен телата и израстъците на присъщите за ЕНС неврони (наречени собствени), в сплетенията ѝ се откриват и автономни влакна, принадлежащи на следвъзлови симпатикови неврони (от мезентериалните ганглии) и на предвъзлови парасимпатикови неврони (вагусови или тазови). Те от своя страна се обозначават като външни за ЕНС.

ЕНС е изградена по общ принцип, а именно под формата на ганглии, свързани с интерганглионерни връзки (фиг. 1). По този начин се образува приплесната мрежовидна структура, наречена сплит, сплетение или плексус (лат.: *plexus*). В областта на червата, ЕНС се представлява от два



Фигура 1. Ентералните плексуси, както биха изглеждали на *wholamount*-препарати (А) и на напречен срез (Б) през чревната стена. Илюстрирани са двата сплита (субмукозен и миентеричен), както и нервните влакна, които инервират мускулните слоеве, лигавицата и интрамуралните артериоли. Автономите нервни влакна навлизат в червото заедно с мезентериалните съдове (Б). Преработена от Furness и Costa (1980).

взаимно свързани плексуса, класически определени като субмукозен сплит, известен и като плексус на Meissner, и миентеричен сплит (познат още като плексус на Auerbach). Първият е разположен в подлигавичната пластинка на органната стена, а вторият се намира между двата подслоя на мускулната обвивка – циркулярния

мускулен подслој (ЦМП) и надлъжния мускулен подслој (НМП). Понякога в литературата може да се срещне и понятието субсерозен плексус, разположен в субсерозата на червата (Crowe и Burnstock 1990). Наличието на подобна структура, причислявана към ЕНС, не е безспорно доказано.

Този строеж на ЕНС се наблюдава най-вече в стената на тънките и дебелия черва. При останалите сегменти на стомашно-чревния тракт, а също и в жлъчния мехур и задстомашната жлеза, част от тези елементи показват различна степен на развитие.

Фокусът на нашето внимание в настоящият труд ще бъдат особеностите на МС. За изграждането на завършена и изчерпателна представа относно морфологията и функцията на тази комплексна нервна структура в червата е направен кратък преглед на морфо-функционалните характеристики и на останалите компоненти на ЕНС (субмукозния и субсерозния плексус).

1.2. Субмукозен сплит (субмукозен плексус, *plexus submucosus*)

Субмукозният сплит е описан за пръв път от Meissner (1857) и Billroth (1858), като традиционно е именуван на името на първия откривател. За разлика от МС, той може да бъде открит само по протежение на тънкото и дебелото черво. Известно количество малки по размер ганглии се откриват и в подлигавичния слой на хранопровода и стомаха, но те не се свързват в сложната мрежа, характерна за субмукозата на чревния отдел. В този участък субмукозният сплит се наблюдава като непрекъсната невронална мрежа, простираща се както по цялата напречна обиколка на червото, така и по цялата му дължина. По правило интерганглионерните връзки в него, както и самите ганглии са по-малки и дискретни, в сравнение с тези, наблюдавани в МС (Timmermans и др. 2001).

Въпреки че МС също варира по своето устройство при различните животински видове, структурните му вариетети са в пъти по-чести при субмукозния му еквивалент (Scheuermann и съавт. 1987a, 1987 b; Hoyle и Burnstock 1989; Timmermans и съавт. 2001; Furness и съавт. 2003). Подобни вариации са установени при

сравнението на находките при морското свинче, както и при по-големи животински видове, включително човека. При морското свинче обикновено се открива само един ред от субмукозни ганглии, съдържащи секретомоторни неврони, но не и мотоневрони за мускулатурата. Още по-конкретно, там са описани в детайли четири типа неврони, посочени по-долу, които се оказват напълно аналогични на тези, описани при т.нар. вътрешен субмукозен плексус на по-едри животни (Furness и съавт. 1984, 2003). По тази причина се приема, че те представляват морфологични и функционални аналози. В по-проксималните отдели на ГИТ на дребните животни, вкл. хранопровод и стомах, субмукозният плексус е представен изключително оскъдно като описаните находки варират от пълна липса на ганглии до разпръснати наредко дребни ганглии в съседство със собствените жлези на хранопровода или в лигавичната мускулна пластинка на стомаха (Rash и Thomas 1962; Christensen и Rick 1985; Izumi и съавт. 2002).

При по-едри животни като котка, куче, прасе или човек, находките се различават драстично от гореописаните. При тях субмукозните ганглии са ясно обособени и отчетливо свързани помежду си чрез интерганглионерни връзки. Освен това, плексусът е разположен на няколко (най-често две, по изключение три) нива (Schabadasch 1930a, 1930 b; Gunn 1968; Hoyle и Burnstock 1989; Timmermans и съавт. 2001). Ганглийните клетки на тези подслоеве се различават както по формата на клетъчните тела, така и по използваните от тях невромедиатори. Невроналният слой, който се разполага по-близо до чревния лумен, наричан вътрешен субмукозен сплит, е аналогичен на този, описан от Meissner (1857) и затова в литературата най-често той носи неговото име. Външният слой (външен субмукозен сплит, *plexus submucosus externus*), намиращ се по-близо до ЦМП е описан първоначално от Henle (1871) и по-късно от Schabadasch (1930b), въпреки че в литературата по-често се среща терминът плексус на Schabadasch. Първоначалните схващания са, че субмукозният плексус е отговорен само за инервацията на лигавичните структури, но понастоящем са налице убедителни доказателства, че малка част от невроните на вътрешния и още по-голяма част от невроните на външния субмукозен плексус изпращат проекции към

МС и по този начин участват в инервацията и на двата мускулни слоя (Sanders и Smith 1986; Furness и съавт. 1990а; Timmermans и съавт. 1994, 1997, 2001; Porter и съавт. 1999).

В хранопровода и стомаха на едрите животни субмукозните ганглии са разположени наредко, но са неоспоримо налични (Schabadasch 1930а; Kyösola и съавт. 1975; Radke и съавт. 1978; Christensen и Rick, 1985; Furness и съавт. 1991; Schemann и съавт. 2001). С най-голяма честота те са открити в пилорния антрум на стомаха. Експериментите, проведени след разслояване на стената на тези органи на подслоеве показват, че регулацията на функциите на стомашната лигавица е дейност предимно на МС и в много по-малка степен на субмукозния сплит (Furness и съавт. 1991; Pfannkuche и съавт. 1998). Въпреки това изследователите приемат, че едно от възможните обяснения на този феномен е трудността двата плексуса да бъдат разграничени един от друг на местата на разширените пространства в мускулатурата, където ЦМП липсва.

Освен в субмукозата, малки групи от невронални тела могат да бъдат открити и в собствената пластинка на лигавицата на тънкото и дебелото черво, а понякога и на стомаха (Newson и съавт. 1979; Fang и съавт. 1993; Valembe и съавт. 1998). Други автори твърдят, че те са просто изместени (ектопични) субмукозни ганглии (Stöhr 1934). В подкрепа на това е фактът, че те винаги се откриват в директен контакт с лигавичната мускулна пластинка, в непосредствена близост с вътрешния субмукозен плексус.

Като обобщение на изложеното дотук можем да кажем, че при по-едрите животни мотоневроните разположени в субмукозния плексус, освен да контролират секретомоторната функция, активно участват и в инервацията на циркулярния мускулен слой. Освен това част от тях прекосяват този слой, достигат до МС, взаимодействат с него и наредко участват дори в инервацията на НМП. При по-дребните животни и в частност при плъха, можем да очакваме, че този плексус ще съдържа само секретомоторни неврони за лигавицата.

1.3. Субсерозен сплит (субсерозен плексус, *plexus subserosus*)

Фина мрежа от нервни влакна, намираща се в субсерозната съединителната тъкан, непосредствено от външната страна на НМП е описана още от Schabadasch (1930b). Това сплетение съдържа единствено снопчета от симпатикови и парасимпатикови влакна, т.е. външни за ЕНС влакна, осъществяващи частична модулация на функциите ѝ (Furness 2006). Малки ганглии (най-вероятно парасимпатикови) могат да бъдат намерени в тази област, особено на местата, където вагусовите влакна навлизат в стената на хранопровода и стомаха, а също и в близост със залавното място на мезентериума. Crowe и Burnstock (1990) описват малки ганглии по външната повърхност на човешките чревни тении, а Kubikova и съавт. (2018) откриват такива и в субсерозната тъкан на човешкия апендикс. Произходът на тези находки не е напълно изяснен, но се предполага че те са ектопични миентерични ганглии.

Тъй като причисляването на т.нар. субсерозен плексус към структурите на ЕНС не е напълно обосновано и общоприето, по-нататък ние ще се придържаме към класическото разбиране, съгласно което ЕНС се състои от субмукозен и миентеричен сплит.

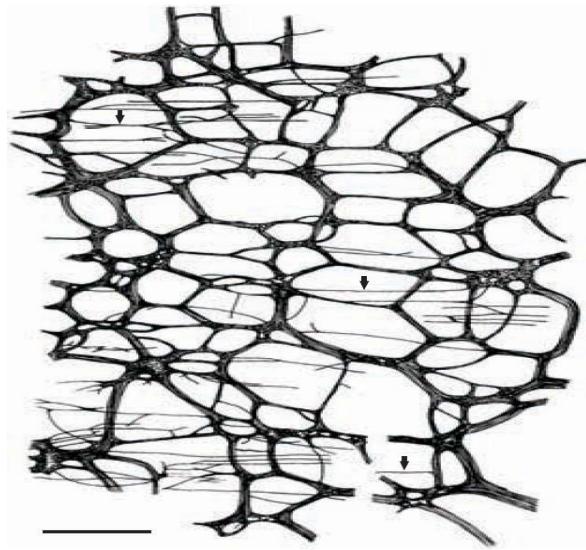
2. Миентеричен сплит (МС)

2.1. Общо устройство на МС

МС е мрежа от миентерични ганглии (МГ) и свързващите ги интерганглионерни връзки, разположена между ЦМП и НМП на *tunica muscularis* на кухите храносмилателни органи. Той се открива по цялата околоръстна обиколка на червото и по цялата дължина на отделните сегменти на ГИТ от горната част на хранопровода до вътрешния анален сфинктер. Това го прави значително по-обширна структура, в сравнение със субмукозния плексус, който с малки изключения е ограничен основно до чревната област.

Съществуват различни варианти при описанието на частите на МС – някои автори описват две, а други – три подразделения (Auerbach 1862; Schabadasch 1930a, 1930b; Stöhr 1934; Li 1940), а именно първичен, вторичен и, евентуално, третичен. Първичният сплит се състои от споменатите ганглии и интерганглионерни връзки (фиг. 2). Голяма част от влакната в една интерганглионерна връзка, обаче, не навлизат в ганглия, към който тя се е насочила, а преминават между него и надлежащия НМП, за да станат част от друга връзка и да се насочат към друг ганглий. Единични неврони понякога се намират и извън ганглиите, обикновено в непосредствена близост до интерганглионерните връзки (Furness 2006).

Вторичният плексус се състои от по-тънки снопчета, разположени успоредно на циркулярните мускулни влакна. Поради това, при анализиране на *wholemout*-препарати, те са тези които имат прав ход и са успоредни едни на други (фиг. 2). Снопчетата, образуващи този плексус се отклоняват или от първичните интерганглионерни връзки или от самите ганглии. В този случай, обаче, те не се насочват към други ганглии. Вторичният плексус се разполага по-повърхностно от първичния, т.е. той се намира в равнината между първичния плексус и ЦМП, като снопчетата му често кръстосват първичните интерганглионерни връзки (Schabadasch 1930b; Stöhr 1952). Освен това е установено, че те навлизат в ЦМП (Wilson и съавт. 1987).



Фигура 2. Скица на МС. Виждат се МГ, интернодалните връзки и малките нервни снопчета, описани в литературата като вторичен плексус. Размерна линия: 1 mm. Auerbach, 1871

Структурата, описваният от някои автори като третичен плексус представлява всъщност най-фините снопчета нервни влакна, които се разполагат в незаетите от първичния и вторичния плексус пространства, като тези влакна изхождат както от ганглиите, така и от първичните и вторични връзки (Richardson 1958; Llewellyn-Smith и съавт. 1993; Furness и съавт. 2000). Тези снопчета навлизат в НМП и е възможно да се открият само в случаите, когато този слой е тънък. Други автори като Schabadasch (1930b) и Li (1940) обединяват описаните дотук вторичен и третичен плексус в единна структура, която наричат вторичен плексус, а това което те наричат третичен плексус практически е описваният от другите автори дълбок (циркулярен) мускулен плексус.

2.2. Структура на МГ

Ганглиите варират по техните размери, форма и ориентация в пространството не само в различните отдели на системата, но и при различните животински видове (Irwin 1931; Gabella 1981a). Въпреки това, морфологията на плексуса обикновено е разпознаваема в даден сегмент на определен животински вид. Броят на невроните в един ганглий варира в широки граници – например в илеума на морското свинче той варира от 5 до повече от 200 клетки. Формата на ганглиите се променя при съкращенията на мускулатурата, тъй като те са лесно деформируеми. По тази причина, при експерименталното определяне на клетъчните параметри, е важно да се има предвид степента на контракция на чревната стена (Gabella и Trigg 1984). Обикновено ганглиите са приплеснати (в равнината между двата мускулни подслоя) и слабо издължени, като по-дългата им ос най-често е ориентирана перпендикулярно на надлъжната ос на органа (Furness 2006).

По отношение на броя на съставлящите го неврони, МС показва съществени различия в отделните сегменти на ГИТ. В хранопровода и проксималната част на стомаха, например, те са най-малко. Междинно място в това подреждане заема тънкото черво. Като най-многобройна остава невроналната популация в дисталната част на стомаха и дебелото черво.

Чрез електронномикроскопски изследвания е установено, че МГ се отличават със значителна компактност (Richardson 1958; Ono 1967; Baumgarten и съавт. 1970; Gabella 1972a; Cook и Burnstock 1976a; Yamamoto 1977; Komuro и съавт. 1982). В тяхното образуване взимат участие само невронални тела, нервни израстъци и помощни клетки (т.нар. ентэрална глия). За разлика от класическите ганглии на автономната нервна система, при тях не е установено наличие на кръвоносни съдове, съединителнотъканни клетки или снопове колагенни влакна (Gabella 1972a). По тези причини е основателно структурата на ентэралните ганглиите да се оприличи повече на тази на централната нервна система, отколкото на тази на периферните ганглии. От наличната литература е видно, че ганглиите се възприемат като разположени всред съединителната тъкан, разделяща двата мускулни слоя (Llewellyn-Smith и съавт. 1993). Вследствие на това, обособена съединителнотъканна капсула не е описана и те се обозначават като некапсулирани образувания.

В самите ганглии, телата на невроните са частично заобиколени от глиални израстъци. Вследствие на това, относително честа находка при тези изследвания, е непокритите участъци на телата да бъдат видяни на повърхността на ганглия, т.е. в пряк контакт с околните тъкани (Gabella 1972a; Komuro и съавт. 1982). Нещо повече, освен като чисто морфологична особеност, този феномен би довел до липса на ефективна кръвно-мозъчна (или кръвно-ганглийна) бариера (Jacobs 1977).

По повърхността на ганглиите често е наблюдавана тънка неклетъчна пластинка, оприличавана на базална ламина (Komuro и съавт. 1982). От нейната външна страна се откриват характерните за хлабавата съединителна тъкан фибробласти и снопове колагенни влакна. Тъй като в ганглиите не се установяват кръвоносни съдове, се предполага че те се изхранват чрез процес на дифузия на хранителни вещества през гореописаната пластинка (Gabella 1972a).

2.3. Невронални структури в мускулния слой на чревната стена

Поради непосредствената пространствена близост, а също и функционална обвързаност на МС с двата подслоя на чревната мускулна обвивка, е необходимо да се обърне внимание и на неврналните структури, откриващи се в тях.

2.3.1. Надлъжен мускулен подслой (НМП)

Количеството и локализацията на неврналните находки в НМП са изцяло зависими от неговата дебелина (Richardson 1958; Llewellyn Smith и съавт. 1993).

В случаите когато НМП е по-дебел от 10 слоя клетки, както е при немалка част от животинските видове, той се инервира от сплетение от фини снопчета нервни влакна с предимно надлъжна ориентация, т.е. ориентирани успоредно на гладкомускулните влакна (Llewellyn Smith и съавт. 1993). Те произхождат от МС и се откриват в цялата дебелина на този мускулен слой. Това устройство се наблюдава както когато НМП е равномерно задебелен, така и когато задебеленията приемат вида на надлъжните ивици, наречени тении (както е при човешкото дебело черво).

В участъците, където НМП е по-тънък от 10 слоя клетки, той се инервира изцяло от третичното сплетение на МС. Неговите нервни снопчета се намират по вътрешната повърхност на НМП и също са ориентирани успоредно на мускулните влакна. Освен това, често те се разполагат в малки браздички, образувани между гладкомускулните клетки (Llewellyn Smith и съавт. 1993).

2.3.2. Циркулярен мускулен подслой (ЦМП)

При по-дребните животни, нервните влакна участващи в инервацията на ЦМП произлизат от първичното и вторичното сплетение на МС. При по-едрите животни това също е валидно за голям процент от нервните влакна. Понастоящем е доказано, обаче, че немалка част от тях произхождат от ганглиите на субмукозния сплит.

Най-общо, нервни влакна се откриват в цялата дебелина на ЦМП. Въпреки това, често би могло да се наблюдава отчетливо струпване от нервни влакна в по-вътрешната част на този слой, т.е. в близост с подлигавичния слой. Тази находка е

многократно описана както при тънкото черво (Li 1940; Gabella 1972b, 1974), така и при дебелилото черво (Faussone-Pellegrini и Cortesini 1984, Faussone-Pellegrini 1985, Christensen и Rick 1987b). В литературата тя може да се срещне с термините дълбок мускулен плексус или субмускуларен плексус. Произходът и значението на двата термина са подробно описани в трудовете на Cajal (1895, 1911), който въвежда два различни термина за на пръв поглед едно и също струпване от влакна. На практика, необходимостта за това разделно наименование на нервните сплитове в чревната стена идва от различното им разположение при различните животински видове. Така например, в тънкото черво на гризачите този плексус се намира всред самия ЦМП, но в непосредствена близост до границата му със субмукозата. По този начин, той отделя от цялата дебелина на ЦМП тънка ивица от мускулни влакна. В тези случаи, сплетението носи името дълбок мускулен плексус (Gabella 1974). Обратно, при дебелилото черво на кучето и свинята, подобна тънка гладкомускулна пластинка не се наблюдава, тъй като нервното сплетение се намира непосредствено от вътрешната страна на ЦМП, на границата със субмукозата. В тези случаи, сплетението се означава като субмускуларен плексус (Christensen и Rick 1987b; Furness и съавт. 1990a).

Независимо от това за кой от двата случая става дума, нервните снопчета се наблюдават по цялото протежение и обиколка на ЦМП на тънкото и дебелилото черво. Преобладаващата им ориентация също е циркулярна, т.е. тя е успоредна на оста на гладкомускулните клетки. Нерядко се наблюдават и коси връзки между успоредните нервни снопчета (Christensen и Rick 1987b).

В литературата няма консенсус по отношение на причината за описаното асиметрично разпределение на влакната, отговорни за инервацията на ЦМП. Въпреки това, изглежда че независимо от кой плексус произхождат или къде в ЦМП се струпват, всички влакна използват еднакъв спектър от невромедиатори. Нещо повече, от описаното дотук е видно, че и при двата мускулни слоя струпването от моторни влакна е в близост с вътрешната граница на съответния слой. Не на последно място е важно да се отбележи, че предаването на нервните импулси към

гладкомускулните клетки става с директното посредничество на т.нар. интерстициални клетки на Cajal. По тази причина последните могат да бъдат открити в непосредствена близост с нервните сплетения, на описаните по-горе локализации (Yamamoto 1977).

2.4. Връзки с околните сплитове

МС се свързва със субмукозния плексус чрез т.нар. „пенетриращи“ или „вертикални“ влакна, които преминават перпендикулярно през ЦМП (Auerbach 1864; Furness и съавт. 1990a; Vrehmer и съавт. 1998). Те осигуряват активната двупосочна комуникация между миентералните и субмукозните неврони, стояща в основата на сложните рефлексни дъги, характерни за ЕНС.

В същото време, МС осъществява връзки и със субсерозното сплетение, което обезпечава функционалната му модификация от вагусовите и мезентериалните симпатикови влакна, разпространяващи се в него. Симпатиковите нерви, насочени към ЕНС, са добре обособени в субсерозния сплит. Те се намират в *tunica adventitia* на интрамуралните артерии и артериоли, където се означават като параваскуларни влакна. За сравнение, влакната предназначени специално за *tunica media* на самите артерии се означават като периваскуларни. При навлизането им в мускулния слой, обаче, те бързо се разпадат на фини клончета, които е невъзможно да бъдат проследени. Парасимпатиковите нерви, както от вагусов, така и от тазов произход, по-често са проследими чак до връзката им с МГ (Christensen и съавт. 1984; Fukai и Fukuda 1984; McRorie и съавт. 1991).

2.5. Морфологична класификация на невроните на МС

Миентералните неврони могат да бъдат класифицирани според тяхната форма, физиологични характеристики, спецификата на тяхното ензимохистохимично и имунохистохимично оцветяване, инервираните от тях структури, използваните невротрансмитери, аферентните и еферентните им връзки и други фактори. Едно от най-значимите постижения на научните изследвания в областта на ЕНС, датиращо приблизително от началото ХХІ век, е дефинитивното установяване на

взаимовръзките между всички тези фактори (Schemann и съавт. 1995; Pfannkuche и съавт. 1998; Lomax и Furness 2000; Michel и съавт. 2000). Това е дало възможност да бъде създадена една пълноценна и единна функционална класификация на ентералните неврони.

Несъмнено клетъчната форма е най-простият и следователно първият използван фактор при опитите за създаване на морфологична класификация. В най-общия случай, невроните изпълняващи еднакви функции имат и сходна форма, което е също толкова приложимо при ЕНС, колкото и при ЦНС (Brehmer и съавт. 1999a; Furness и съавт. 2004). Удачни примери за неврони с еднакви функции и форма при различни животински видове са мотоневроните в предните рога на сивото вещество на гръбначния мозък, малкомозъчните неврони на Пуркиние, пирамидните неврони на крайномозъчната кора, ретиналните ганглийни клетки, псевдоуниполарни неврони в спиналните ганглии и много други. Това е причината дори и в наши дни да се приема за обосновано, че клетъчната форма може да бъде основен индикатор при описанието на невроните. Трябва обаче да се изтъкне, че функционално еквивалентните неврони на по-едрите животни имат по-добре развити и по-сложно устроени дендритни разклонения, в сравнение с тези от по-малки животни (Purves и Lichtman 1985; Purves и съавт. 1986; Tabatabai и съавт. 1986). Пример за това са разгледаните по-долу *Dogiel* тип 1 неврони, които имат значително по-къси и слабо разклонени дендрити при мишката и плъха, в сравнение с тези на кучето, свинята и човека (Stach 1980; Furness et Costa 1987; Nurgali и съавт. 2004). Освен това може да се заключи, че функционалните взаимоотношения между отделните неврони ще бъдат по-лесни за описание и интерпретация при малките животни, където невроналната морфология и рефлекторния апарат са по-прости (Brehmer и съавт. 2004b).

Първата, най-утвърдена и валидна и до наши дни класификация на ентералните неврони, основаваща се на тяхната форма, е тази на *Dogiel*. Той описва морфологията на миентеричния и субмкозния сплит на червата на морско свинче, плъх, заек, котка, куче и човек (1899), като най-същественният му принос са описанията при човека и

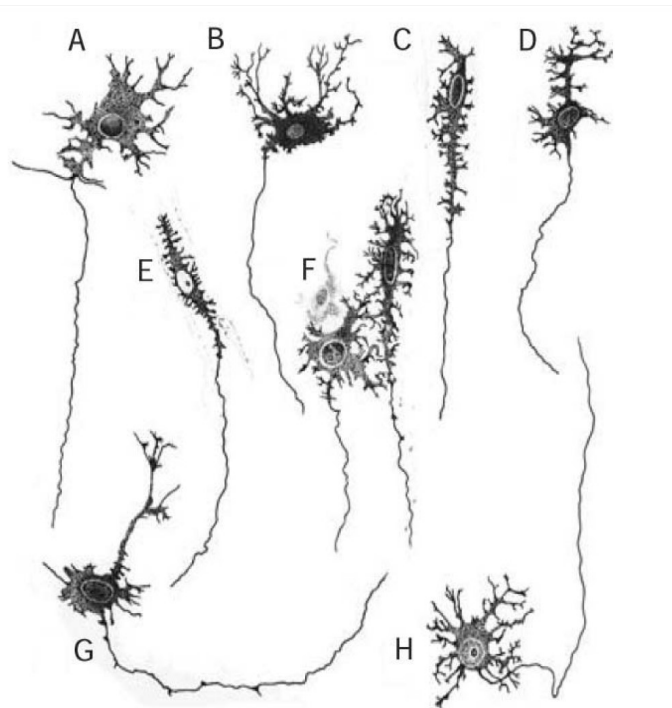
морското свинче. Според Dogiel има три типа неврони, приели през годините неговото име – неврони тип *Dogiel* 1, 2 и 3. Всички последващи изследвания в областта потвърждават неговите открития, като по-късно част от тези неврони се разпределят в допълнителни групи, респективно означени като тип 4, 5, 6 и 7.

2.5.1. *Dogiel* тип 1 неврони

Dogiel (1899) оригинално описва телата на тези неврони като плоски, леко издължени и със звездовидни контури (фиг. 3). Размерите им варират между 13 и 35 μm на дължина и между 9 и 22 μm на ширина. Те притежават от 4 до 20 дендрита и един аксон. Характерни за тях са ламеларните, приплеснати дендрити, разположени в равнина, аналогична на тази на МС. Най-често те се отдалечават на съвсем кратко разстояние от клетъчните тела, но е възможно да дават начало на няколко къси вторични израстъка. По-съвременни изследвания сочат, че част от перикарионите имат гъбовидни израстъци, които се отличават по това, че се намират над и под равнината на плексуса (Costa и съавт. 1982; Furness и съавт. 1989). Dogiel съобщава, че аксонът на невроните от този тип напуска пределите на съответния ганглии и преминава през не повече от четири други ганглия, преди да навлезе в ЦМП. Понастоящем е известно, че последното твърдение е валидно за повечето от невроните от тип 1, но не за всички.

Модерните техники за визуализация напълно потвърждават морфологичното описание на тези неврони от Dogiel, както и предположението му, че това е основен клетъчен тип в ЕНС на бозайниците (Hanani и съавт. 1998; Brehmer и съавт. 1999a). В допълнение е доказано, че аксоните им понякога се разклоняват съвсем близо до аксоналното хълмче и тези разклонения често имат шипчета в началната си част, т.е. в първите 100 μm от аксоналната дължина. Аксоните обикновено се отделят от перикарионите, но е възможно отделянето им и от по-голям дендрит (Brehmer и съавт. 1999a).

Във функционално отношение, невроните от този тип не образуват една однородна група, т.е. те могат да изпълняват различни функции. Те могат да бъдат възбудни или инхибиторни мотоневрони за ЦМП, възбудни или инхибиторни мотоневрони неврони за НМП, възходящи или низходящи интерневрони и др. (виж Табл. 1).



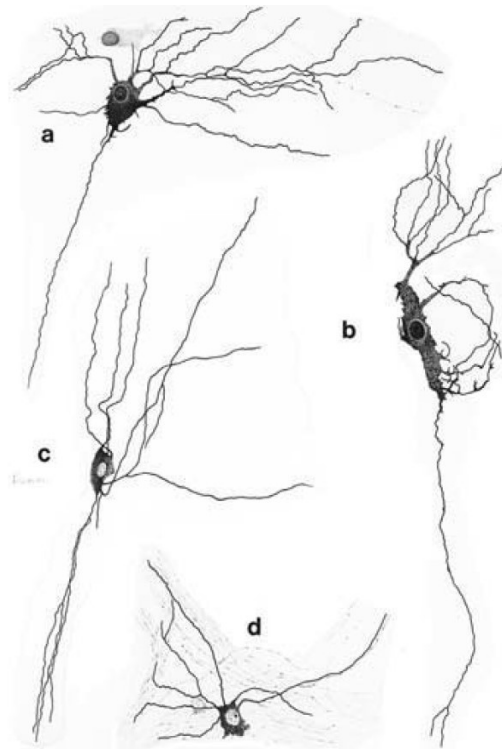
Фигура 3. Скици на неврони Dogiel тип 1. Неврони A, C, E, F и H – от МС на тънко черво на морско свинче; D и G – от МС на тънко черво на човек; B – от жлъчен мехур на куче. Dogiel, 1899.

В исторически аспект са описани съществени различия при определянето на точните морфологични характеристики на невроните, които трябва да се причислят към тази група. Така например, Hill (1927) и Sokolowa (1931) описват неврони с къси, тънки и заострени дендрити. Те ги причисляват към тази група, но по-късно е установено, че те трябва да се причислят към невроните от тип 3, а дори и към по-съвременния тип 4.

2.5.2. Dogiel тип 2 неврони

Това са едни от най-разпространените неврони в ЕНС на червата, но те са особено редки в стомаха. При червата, те съставляват 10-25% от невроналната популация на МГ (Furness 2006). Описани още от Dogiel (1899), тези неврони притежават относително големи тела, с кръгла или овална форма (фиг. 4). В своето оригинално

описание Dogiel постулира, че подобно на невроните от тип 1, те са моноаксонални с налични между 3 и 10 дендрита и един аксон. Това твърдение несъмнено се основава на факта, че в периода на неговите изследвания е било наложено схващането, че невроните могат да имат само един аксон. Понастоящем обаче е известно, че всички израстъци на невроните от този тип са аксони както в морфологичен, така и във функционален аспект (Stach 1981; Hendriks и съавт. 1990). Понякога тези неврони могат да имат само един израстък, който скоро след образуването си се разделя на две, също както при невроните от тип 1.



Фигура 4. Скици на различни Dogiel тип 2 неврони. Неврони А и В – от *plexus myentericus* на тънко черво на морско свинче; С – от *plexus myentericus* на тънко черво на човек; D – от *plexus myentericus* на дебело черво на морско свинче. Dogiel, 1899.

Dogiel описва клетъчната повърхност на тези неврони като гладка, но съвременните изследвания показват, че тя често е неравна или набраздена. Pompolo и Furness (1988) обясняват този факт с преминаващите в съседство снопове влакна. Документираните от Dogiel средни размери на перикарионите са 13 – 22 μm при по-малките представители на групата и 22 – 47 μm при по-големите. Съвременните изследвания потвърждават тези числови стойности (Hanani и съавт. 1998; Brehmer и съавт. 1999a).

Според Furness (2000), Dogiel тип 2 невроните на миентеричния и субмукозния сплит са основните представителни на сетивните неврони в ЕНС или т.нар. собствени първични сетивни неврони (СПАН, англ.: *IPAN, Intrinsic Primary Afferent*

Neurons). Фактът, че така те ще взимат участие в образуването на сложни рефлексни дъги, трябва да се има предвид при запознаване с техните проекции.

Dogiel (1899) установява, че преобладаващото количество от влакната откривани в чревната лигавица, са именно от неврони от тип 2. Според него обаче, те принадлежат на неврони, локализирани изключително в субмукозния сплит. Несъмнено причината за това заключение е, че той е използвал *wholemound*-препарати от сепарирани слоеве на чревната стена. Поради това, Dogiel не е имал възможност да установи проекциите на миентералните неврони към чревната лигавица. Понастоящем е изяснено, че значителна част от миентериалните *Dogiel* тип 2 неврони на мишката, морското свинче, свинята и човека също изпращат лигавични проекции (Furness и съавт. 1990b, 2004; Song и съавт. 1991, 1994; Neunlist и Schemann 1997; Lomax и Furness 2000; Vogalis и съавт. 2000; Brehmer и съавт. 1999b; Hens и съавт. 2000, 2001). При преминаването през субмукозния сплит, те изпращат колатерали към неговите ганглии. Хипотезите, че всички миентерални *Dogiel* тип 2 неврони изпращат проекции към мукозата са потвърдени само при тънкото черво на морското свинче (Song и съавт. 1994).

Техниките с интрацелуларно инжектиране на оцветители показват, че еференциите на невроните от този тип се разпространяват в МС с подчертано циркулярен характер, т.е. перпендикулярно на оста на червото (Dogiel 1899; Bornstein и съавт. 1991b). Те изпращат множество колатерали, които завършват с варикозно-разширени терминали в същия или съседни МГ. Електронномикроскопските наблюдения показват, че варикозните терминали осъществяват синапси както с неврони от същия тип, така и с такива от други типове (Pompolo и Furness 1988).

Терминалните окончания на еференциите на невроните от този тип най-често са в МГ, съседни на този съдържащ съответния перикарион (Brookes и съавт. 1995). Въпреки това се откриват и такива с по-дълги анално-насочени проекции, като единици от тях се отдалечават с до 100 mm. Изследванията с интрацелуларни оцветители показват, че те завършват отново в МГ (Johnson и съавт. 1996). Тази

особеност не е характерна за субмукозните неврони от този тип и при тях не се наблюдават дълги проекции (Song и съавт. 1992).

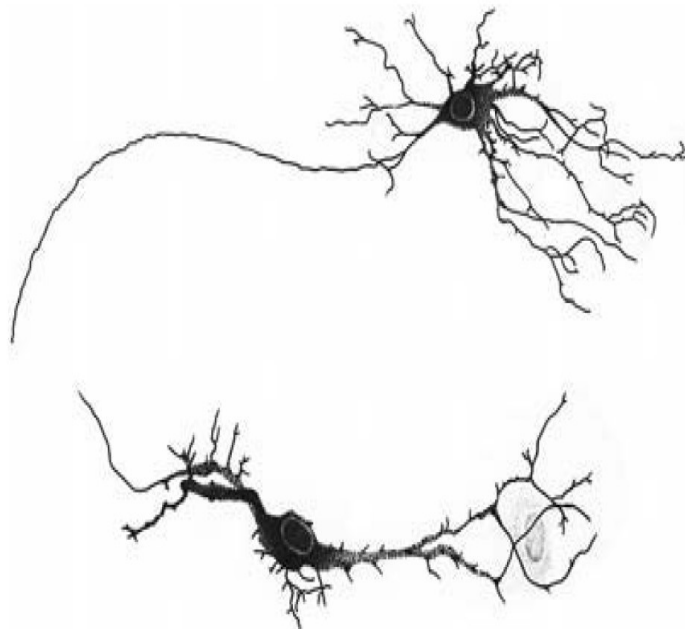
Друга морфологична особеност на тези неврони, потвърдена с помощта на електронната микроскопия, е наличието на многобройни митохондрии и лизозоми в тяхната цитоплазма (Pompolo и Furness 1988). В съчетание с относително големите клетъчни размери, тази особеност нерядко дава възможност същите неврони да се отдиференцират с помощта на техники като ензимохистохимия. По отношение на имунохистохимичното им локализиране трябва да се отбележи че 80-90% от тези неврони са имунореактивни към калций-свързващия протеин калбиндин (Iyer и съавт. 1988; Song и съавт. 1991).

Интересен факт е, че през годините е описана още една разновидност на *Dogiel* тип 2 невроните. Те се наричат дендритни неврони от тип 2, поради наличието на къси дендритоподобни израстъци от перикариона, който обикновено е с гладка повърхност (Stach 1989; Bornstein и съавт. 1991; Brookes и съавт. 1995). Въпреки характерната им морфология, ние не открихме в литературата конкретни данни за функционалното естество на тези израстъци, т.е. дали те са доказано дендрити. Част от тези израстъци са варикозно разширени в крайните си части и осъществяват синапси с близко разположени клетки, т.е. по-вероятно е те да са аксони (Nurgali и съавт. 2003). Това се потвърждава и от факта, че всички израстъци на *Dogiel* тип 2 невроните, включително дендритоподобните, не показват имунореактивност към дендритния маркер MAP2 (Murofushi и съавт. 1989; Scheuermann и съавт. 1991). Единствената изтъкната разлика между класическите неврони от тип 2 и дендритните неврони, която ние успяхме да открием, е че последните рядко изпращат влакна към същия или съседните ганглии, но значително по-често изпращат дълги проекции в анална посока (Bornstein и съавт. 1991; Brookes и съавт. 1995). В тези ганглии, те отново синаптират с други неврони от тип 2. Последното най-вероятно означава, че невроните от този подвид имат по-специфично значение за рефлекторния апарат в ЕНС.

2.5.3. *Dogiel* тип 3 неврони

Тези неврони са описани от Dogiel (1899) като нервни клетки, имащи от 2 до 10 дендрита (фиг. 5). За разлика от невроните от тип 1, техните израстъци са подчертано стеснени и силно се разклоняват скоро след тяхното излизане от перикариона. Освен това, те са къси и не напускат пределите на съответния МГ. Повърхността на дендритите най-често е гладка, но понякога могат да се наблюдават варикозни разширения. Аксонът започва от аксонално хълмче от тялото или от друг израстък, като в началния си сегмент нерядко дава начало на колатерали.

Почти всички споменати характеристики на невроните от тип 1 и 2, описани от Dogiel, се потвърждават от съвременните изследвания и в мненията на авторите не се наблюдават съществени противоречия. При оформяне на съвременния облик на третия тип неврони обаче, противоречиви възгледи съществуват. Например, към тази група са добавени и неврони, чиито дендрити също са тънки, но са значително по-дълги от



Фигура 5. Скици на Dogiel тип 3 неврони от минетеричния сплит на дебелото черво на морско свинче. Горният неврон е типичен представител на т.нар. филаментозни неврони. Dogiel, 1899.

описаните от Dogiel. При тяхното първоначално описване в червата на морското свинче, те са наречени филаментозни неврони (Portbury и съавт. 1995; Lomax и съавт. 1999). Въпреки, че основната част от работата на Dogiel и по-съвременните автори е извършена върху морското свинче, неврони открити в чревната стена на свинята

също намират място в тази група (Stach 1982a, Timmermans и съавт. 1993). Мнозинството от тях имат дълги анално-насочени проекции, които не напускат МС. Освен това са описани и такива, които напускат пределите на чревната стена и по хода на симпатиковите нерви достигат до превертебралните ганглии.

2.5.4. Неврони тип 4, 5, 6 и 7

През последните десетилетия класификацията на Dogiel (1899) е доразвита чрез добавянето на четири нови групи. Подобно на невроните от тип 3, „новите“ типове неврони също се откриват в доста ограничен набор от животински видове и също показват по-слабо изразени различия помежду си (Stach, 1989; Stach и съавт. 2000; Brehmer и съавт. 1999a, 2004a). *Dogiel* тип 4 невроните първоначално са били определяни като тип 3. За първи път те са описани при свинята, където е установено, че немалка част от тях са секретомоторни (Brehmer и съавт. 1999b). Тези неврони имат един аксон, който е ориентиран перпендикулярно на чревната стена и в литературата често е означаван като вертикален. Той прекосява ЦМП и достига до лигавицата. Налични са и къси, заострени дендрити, които за разлика от представителите на тип 3, са слабо разклонени (Stach 1982b, 1989). Друга характерна особеност на дендритите е, че са струпани на ограничена площ, т.е. образуват се предимно в единия полюс на перикариона. Това от своя страна, често е съпроводено с ексцентрично разположение на ядрото.

Dogiel тип 5 невроните също са открити за първи път при свинята (Stach 1985). Те са мултиполарни неврони, които имат един аксон и множество дълги, разклонени дендрити (Stach 1989). Подобно на предишния описан тип, ядрото им също е разположено ексцентрично. Важно е да се отбележи, че към тази група се причисляват и определен вид от човешките миентерални неврони (Brehmer и съавт. 2004b). Тяхната най-отличителна черта е, че и дендритите и аксонът излизат от един общ задебелен израстък на перикариона.

Dogiel тип 6 и тип 7 невроните също имат един аксон и фини дендрити. Освен от тялото, последните често започват и от началния сегмент на аксона (Stach, 1989 Stach et al., 2000). Част от тях могат да притежават внушителни клетъчни размери.

2.6. Функционална класификация на невроните на МС

Изясняването на функционалната принадлежност на ентэралните неврони е важно, тъй като съществува подчертана корелация между нея и неврохимичните особености на невроните. Най-детайлната такава класификация е направена за ЕНС на морското свинче като при нея са описани 17 групи неврони (Furness и съавт. 1994а, 2000; Costa и съавт. 1996). С малки изключения, същите групи се откриват и в дебелото черво (Lomax и Furness 2000). Освен това, много от тези групи могат да бъдат разделени на подгрупи. Например, низходящите миентэрални интерневрони (с проекции в анална посока) съществено се различават едни от други по неврохимичните си характеристики (Табл. 1). Приложимостта на тези познания за неврохимичната природа на миентэралните неврони при други животински видове е предполагаема, но ние не успяхме да открием в литературата конкретни данни в тази насока.

Тук ще се спрем само на основните невронални функционални групи в МС. Те са четири: мотоневрони, интерневрони, собствени първични аферентни неврони и интестинофугални неврони, като всеки от тях има и подгрупи.

2.6.1. Мотоневрони

Когато се говори за моторна инервация, трябва да се направи уточнението, че освен собствените за ЕНС неврони в МС е възможно да бъдат установени и влакна на външни такива, т.е. на симпатикови и парасимпатикови неврони (Furness 2006). От последните групи има само три вида неврони, които директно инервират структури в ГИТ – вагусови мотоневрони за напречноабраздения мускул на хранопровода, симпатикови мотоневрони за циркулярната гладка мускулатура, основно сфинктери,

Таблица 1. Характеристика на невроналните типове, описани в МС на тънкото черво на морското свинче. ACh – ацетилхолин; ATP – аденозин трифосфат; BN – бомбезин; CCK – холецистокинин; ChAT – холин ацетилтрансфераза; CART – cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide; CGRP – calcitonin gene-related peptide; CR – калретинин; CRF – кортикотрофин-освобождаващ фактор; DN – динорфин; ENK – енкефалин; GABA – гама аминокиселина; GAL – галанин; GRP – гастрин-освобождаващ пептид; 5-HT – 5-хидрокситриптамин; IB4 – изолектин B4; NeuNcyt – цитоплазматична имунореактивност за невроналния ядрен протеин NeuN; NFP – неврофиламентен протеин NK; NOS – азотен оксид синтаза; NPY – невропептид Y; PACAP – питуитарен аденилат циклаза-активиращ пептид; SOM – соматостатин; TK – тахикинин; VIP – вазоактивен интестинален пептид. Преработена от Furness, 2006

Изпълнявана функция	%	Морфология	Химична кодировка	Трансмитер/Забележки
Възбудни мотоневрони за ЦМП	12%	<i>Dogiel</i> тип 1	Къси: ChAT/TK/ ENK/GABA Дълги: ChAT/TK/ ENK/NFP	Основни трансмитери ACh, TK
Инхибиторни мотоневрони за ЦМП	16%	<i>Dogiel</i> тип 1	Къси: NOS/VIP/ PACAP/ENK/NPY/ GABA Дълги: NOS/VIP/ PACAP/DN/BN/NFP	NO, ATP, VIP, PACAP (разл. съотношения)
Възбудни мотоневрони за НМП	25%	<i>Dogiel</i> тип 1 (малки)	ChAT/CR/TK	Основни трансмитери ACh, TK
Инхибиторни мотоневрони за НМП	2%	<i>Dogiel</i> тип 1	NOS/VIP/GABA	NO, ATP, VIP, PACAP (разл. съотношения)

Възходящи интерневрони за локални рефлексии	5%	<i>Dogiel</i> тип 1 (големи)	ChAT/CR/ TK/ENK	Основни трансмитери ACh, TK
Низходящи интерневрони за локални рефлексии	5%	<i>Dogiel</i> тип 1	ChAT/NOS/VIP±BN ±NPY	Основни трансмитери ACh, ATP
Низходящи интерневрони за секретомоторни рефлексии	2%	<i>Dogiel</i> тип 1	ChAT/5-HT	Основни трансмитери ACh, 5-HT
Низходящи интерневрони за мигриращи миоелектрични комплекси	4%	<i>Dogiel</i> тип 3	ChAT/SOM	Основен трансмитер ACh
Миентерални СПАН	26%	<i>Dogiel</i> тип 2	ChAT/TK/орексин/ IB4/NeuNcyt/ калбиндин	Основни трансмитери ACh и TK
Интестино- фугални неврони	<1%	<i>Dogiel</i> тип 1	ChAT/BN/VIP/NOS/ ССК/ENK	Основни трансмитери ACh, VIP
Мотоневрони към ентероендо- кринните клетки	-	<i>Dogiel</i> тип 1	-	Напр. за инервация на гастрин- продуциращи клетки

и симпатикови мотоневрони за артериалната *tunica media*. Всички останали външни за ЕНС влакна достигат таргетните ефектори индиректно, посредством синапси с невроналните вериги на ЕНС.

Собствените мотоневрони за МС са два вида – за ЦМП и за НМП, като невроните и на двата вида допълнително се подразделят на възбудни и задръжни. В допълнение на изброените групи, в субмукозния сплит могат да се открият и други като напр. мотоневрони за лигавичната мускулна пластинка, секретомоторни неврони, вазомоторни неврони и такива, инервиращи ентероендокринните клетки (Sanders и Smith 1986).

Обобщена информация за всички клетъчни видове открити в МС може да бъде намерена в Табл. 1. Трябва да се отбележи, че при изписването на химичната кодировка на отделните типове неврони, обикновено се използват синтезиращите ги ензими (напр. ChAT и nNOS), а не самия медиатор. Освен това, тези медиатори често са в коекзистенция с други специфични вещества, използвани за отдиференциране на отделните видове и съответно изписвани при кодирането.

2.6.1.1. Мотоневрони за ЦМП

Тези неврони са типичен компонент на МС. При морското свинче цялата невронална популация от този тип е разположена в МС (Wilson и съавт. 1987). При други животински видове обаче, находките са по-различни. При плъха (Ekblad и съавт. 1987, 1988), кучето (Sanders и Smith 1986; Furness и съавт. 1990a) и свинята (Timmermans и съавт. 2001), такива неврони се откриват и във външния субмукозен сплит. Тези неврони участват в инервацията както на сфинктерите, така и не-сфинктерните участъци на ГИТ. Основните медиатори при възбудните мотоневрони са ацетилхолинът (ACh) и тахикинините, а при инхибиторните – азотният оксид (NO) и вазоактивния интестинален пептид (VIP) (Brookes и съавт. 1991). При почти всички животински видове, включително човека, мотоневроните са с *Dogiel* тип 1 морфология (Ward и съавт. 1992; Timmermans и съавт. 1993; Furness и съавт. 1994a; Costa и съавт. 1996; Nurgali и съавт. 2004). Изключения се наблюдават при свинята

(Timmermans и съавт. 1994), където невроните от тази група са *Dogiel* тип 3 и 6. Експериментално е доказано, че влакната на възбудните мотоневрони достигат области от ЦМП до 5 mm в орална, и до 2 mm в анална посока, спрямо местоположението на перикариона. В сравнение с това, инхибиторните мотоневрони се различават по трансмитерния си състав и се разпространяват строго в анална посока: от 0 до 6 mm спрямо невроналното тяло (Costa и съавт. 1981; Costa и Furness 1983; Daniel и съавт. 1987; Ekblad и съавт. 1987, 1988; Brookes и съавт. 1991; Williamson и съавт. 1996). Отделните неврони инервират циркулярно ориентирани ленти от гладък мускул с ширина 0.5 – 2 mm (Nurgali и съавт. 2004; Furness и Bornstein 1991).

2.6.1.2. Мотоневрони за НМП

В литературата най-често се среща твърдението, че телата на мотоневроните за НМП са локализирани изключително в МГ. Въпреки това, тези данни са изцяло потвърдени само при тънкото черво на морското свинче (Brookes и съавт. 1991). При по-едрите животни (свиня и най-вероятно човек), има данни че малък процент от тези мотоневрони са локализирани във външния субмукозен сплит, по подобие на тези за ЦМП (Llewellyn Smith и съавт. 1993).

Отделните неврони инервират издължени участъци от гладкия мускул с размери 2 mm на дължина и 1 mm на ширина, ориентирани успоредно на оста на червото (Furness и съавт. 2000). Въпреки относително малката дебелина на НМП, мотоневроните за него са изненадващо многобройни: те съставляват над 25% от общата невронална популация на МГ (Табл. 1).

2.6.2. Интерневрони

Ентералните интерневрони са една от най-хетерогенните клетъчни групи в ЕНС. За разлика от мотоневроните и СПАН, които имат сходни характеристики при различните сегменти на ГИТ, интерневроните показват съществени различия при дебелото черво, спрямо другите области (Furness 2006).

В МС, интерневроните образуват невронални вериги, разпространяващи се както в орална, така и в анална посока (Pompollo и Furness 1993; Portbury и съавт. 1995; Young и Furness 1995). В ЕНС са описани четири типа интерневрони: един тип с орално-насочени проекции и три с анално-насочени проекции. Първият тип има кодировка, сходна с тази на възбудните мотоневрони за НМП – ChAT/TK/Calretinin, а тези с анално-насочените проекции се кодират като ChAT/NOS, ChAT/5-HT и ChAT/SOM (Табл. 1). Интерневроните с възходящи проекции, както и ChAT/NOS и ChAT/5-HT интерневрони с низходящи проекции медиират локални ентэрални рефлексни дъги. В допълнение, ChAT/5-HT невроните участват и в локални секретомоторни рефлексии (Wardell и съавт. 1994). Всички те са типични както за тънкото, така и за дебелото черво. За разлика от тях, ChAT/SOM интерневроните специфично участват в генерирането на вълни от възбудни импулси, разпространяващи се в анална посока на голямо протежение от ГИТ. Тези вълни са функция на собствените за ЕНС невронални вериги и се наричат мигриращи миоелектрични комплекси. За разлика от предходните видове, които характерно имат *Dogiel* тип 1 морфология, ChAT/SOM интерневроните са *Dogiel* тип 3 – с многобройни разклонени, заострени и филаментозни дендрити (Portbury и съавт. 1995; Song и съавт. 1997). Те показват активност при експерименти с разтягане на чревната стена, но проекции на СПАН към тях почти не се установяват (Bornstein и съавт. 1991; Stebbing и Bornstein 1996; Pompollo и Furness 1998; Thornton и Bornstein 2002). В областта на дебелото черво обаче, ChAT/SOM неврони не се установяват, което всеобщо се приема и за причината мигриращите миоелектрични комплекси да се наблюдават в стомаха и всички части на тънкото черво, но не и в колона (Furness 2006).

Необходимо е да се отбележи също, че съществува малка популация от субмукозни неврони с кодировка NOS/VIP, които изпращат проекции към МС, без да дават колатерали към лигавични и подлигавични структури (Furness и съавт. 1994a; Song и съавт. 1998). По тази причина се предполага, че това са мигрирали в

субмукозния сплит миентерални неврони и следователно е допустимо те също да бъдат прибавени към класификацията на миентералните интерневрони.

2.6.3. Собствени първични аферентни неврони (СПАН)

Ентералните рефлексии, които регулират моториката, кръвоснабдяването и секреторната активност на червата, водят началото си от собствени за ЕНС неврони, реагиращи на редица стимули, като разтягане на стената, наличие на луминално съдържимо и механично дразнене на лигавиците. Тези неврони притежават *Dogiel* тип 2 морфология. Интересно е, че още при създаването на своята класификация, самият Dogiel (1899) приема, че невроните с тази морфология най-вероятно са основният вид аферентни ентерални неврони. Исторически те са били наричани по различен начин, докато не се е утвърдил въведеният от Kirchgessner и Gershon (1988) термин, а именно СПАН. Този термин е въведен и е предпочитан при описанието на тези клетки поради спецификата на висцералната инервация като цяло. Тъй като автономната нервна система е силно ограничена във възможността си за провеждане на осъзната сетивност (Grundy и Scratcherd 1989; Cervero 1994), Kirchgessner и Gershon предпочитат да нарекат тези неврони СПАН. По тази причина, когато става дума за тези специфични клетки е прието терминът „аферентен“ да се използва с предимство пред „сетивен“.

Наличие на СПАН е описано и в субмукозния, и в миентеричния сплит. Субмукозните СПАН изпращат проекции както към други субмукозни ганглии (Furness и съавт. 2003а), така и към миентеричните (Kirchgessner и Gershon 1988; Song и съавт. 1998). Миентералните СПАН имат аксони, които дават колатерали към редица други миентерални неврони, които включват други СПАН, интерневрони и мотоневрони. Освен това, те изпращат проекции и към субмукозните ганглии (Pompollo и Furness 1988; Song и съавт. 1998). Основните видове миентерални СПАН са два: такива, които реагират на луминални дразнителни и такива, чувствителни към разтягане.

Чувствителните към луминални дразнители СПАН реагират на попаднали в чревния лумен химични вещества, например неорганични киселини или глюкоза (Kunze и съавт. 1995; Bertrand и съавт. 1997). Такива неврони са открити освен в миентеричния, и в субмукозния сплит. Освен това, тяхната дразнимост се запазва и след блокиране на синаптичната трансмисия, т.е. въпреки локализацията им в МС, тяхната възбудимост е директна, а не чрез участието на други неврони.

Чувствителните на разтягане миентерални СПАН притежават по техните периферни израстъци механозависими йонни канали, които генерират импулси при промени във формата на чревната стена (Kunze и съавт. 1998, 2000). Техни дразнители са както екзогенни механични фактори, приложени върху чревната стена, така и мускулните съкращения. Това е възможно, тъй като при съкращението си самите мускулни влакна увличат със себе си и съединителнотъканния матрикс, в който са разположени периферните израстъци на СПАН (Kunze и съавт. 1999). Това, от своя страна, води до деформация на нервните клетки с последващо отваряне на механозависимите йонни канали. Експериментите включващи блокиране на синаптичната трансмисия отново потвърждават, че те се възбуждат директно, а не с помощта на други клетки (Kunze и съавт. 1999, 2000).

При количествена съпоставка на наличните данни се забелязва, че около 60% от миентералните СПАН са чувствителни към луминални дразнители като неорганични киселини, основи или мастни киселини (Bertrand и съавт. 1997, 1998). В същото време, 80% от СПАН реагират на циркумферентно разтягане на чревната стена (Kunze и съавт. 1998). На базата на това може да се направи основателното предположение, че съществува фракция от тези неврони, чувствителна и към двата стимула, т.е. тя е полимодална.

СПАН дават началото на гъста мрежа от влакна, заобикаляща останалите невронални тела както в същия, така и в съседните МГ (Furness и съавт. 1990b; Vornstein и съавт. 1991). Електронномикроскопски е потвърдено, че влакната на тази мрежа синаптират с клетъчните тела в ганглиите, включително и с тези на други неврони от същия тип (Kunze и съавт. 1993; Pompolo и Furness 1988). Става ясно, че

СПАН образуват помежду си невронални мрежи и тъй като трансмисията между отделните клетки е възбудна, тези мрежи са взаимно подсилващи се (Wood 1994; Bertrand и съавт. 1997; Kunze и Furness 1999).

2.6.4. Интестинофугални неврони

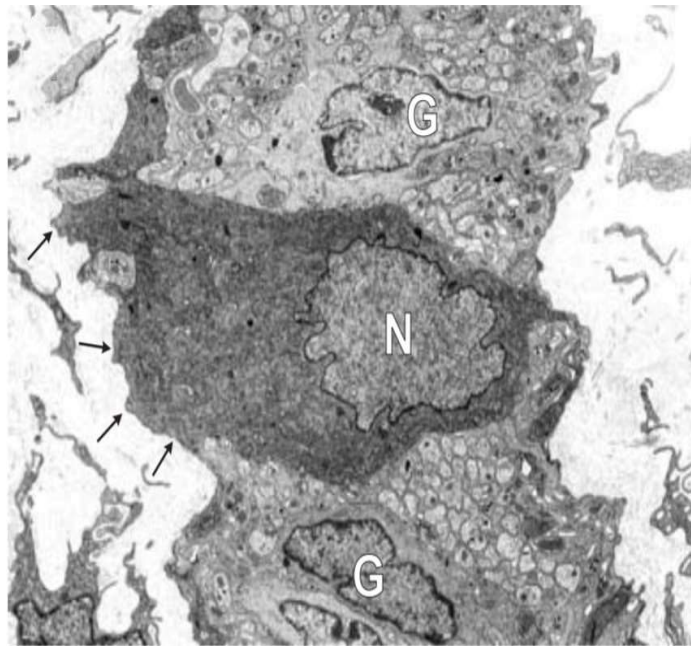
Перикарионите на интестинофугалните неврони се разполагат в МС и проецират израстъците си към превертебралните ганглии, където образуват синапси със следвъзлови симпатикови неврони (Szurszewski и Miller 1994). В литературата те могат да бъдат срещнати с латинската абrevиатура *IFAN* (от англ. – *Intestinfugal Afferent Neurons*), поради факта че пренасят аферентни импулси, генерирани от ЕНС (Szurszewski и съавт. 2002). При дребни бозайници, тези неврони са характерни само за МС (Barbiers и съавт. 1993). Те имат предимно *Dogiel* тип 1 морфология, но се срещат и такива с *Dogiel* тип 2. При по-едрите бозайници, напр. свинята, тези неврони образуват аферентният компонент на ентено-ентералните рефлексни дъги (Szurszewski и Miller 1994). Това са рефлексите, генерирани в чревната стена, и които в крайна сметка завършват обратно в нея. Участващите в тях еферентни симпатикови неврони инхибират мотилитета и секретомоториката. Освен това, в ректума е описана и още една интересна разновидност на тези неврони, които изпращат проекции директно към гръбначния мозък (Neuhuber и съавт. 1993).

2.7. Ентерална глия

В ентералните ганглии се наблюдават помощни клетки, наричани най-общо ентерална глия. Те са описани още от Dogiel (1899) и са наречени от него сателитни клетки. По-късно такива клетки са наблюдавани и в интерганглионерните връзки, където са наречени Шванови клетки (Stöhr 1952). Чрез по-съвременните имунохистохимични методики е установено, че тези клетки експресират глиален фибриларен кисел протеин (Jessen и Mirsky 1980, 1983) и S-100, който е Ca^{2+} -свързващ протеин (Fertt и съавт. 1982). Първият от тях не се открива в ганглиите на автономната нервна система, а двата заедно са типични за астроцитите на ЦНС (Jessen и Mirsky 1983). Освен това, електронномикроскопските изследвания

показват, че тези сателитни клетки повече наподобяват астроцитите, отколкото Швановите клетки (Gabella 1971, 1972a, 1981b; Cook и Burnstock 1976b; Komuro и съавт. 1982).

Ентералните сателитни клетки и техните израстъци покриват само частично невроналните тела и аксони, като оставят оголени участъци от последните на повърхността на ганглиите (фиг. 6). Освен това, при взаимоотношенията между тези два типа клетки се наблюдават съществени различия при малките и големите животни, факт забелязан още от Auerbach (1864). Така например, при морското свинче израстъците на глиалните клетки не разделят отделните аксони, а по-скоро само ги групират



Фигура 6. Електронномикроскопски снимки на глиални клетки, разположени около неврон. Стрелките указват оголен участък от невроналната повърхност, който е в контакт с околните тъкани. N: ядро на неврон; G: ядро на глиална клетка. Котуро и съавт. 1982.

(Gabella 1972a; Komuro и съавт. 1982). По този начин много влакна се оказват в непосредствен контакт едни с други. В интерганглионерните връзки, например, около 600 аксона могат да бъдат в контакт с една сателитна клетка (Gabella 1981b). При котката и човека, от друга страна, влакната са добре отграничени едни от други, чрез добре оформен слой от глиални израстъци (Baumgarten и съавт. 1970). Вследствие от тези различия, съотношението между броя на невроните към този на

глиалните клетки в МС на малките животни е около 1:1.1, а при по-едрите – около 1:4.5 (Gabella и Trigg 1984).

При електронномикроскопски наблюдения глиалните клетки лесно могат да се отдиференцират от невроните. Техните ядра, например, притежават характерно натрупване на маргинален хетерохроматин в съседство с ядрената мембрана, която от своя страна показва дълбоки инвагинации (фиг. 6). Техен още по-специфичен маркер са многобройните глиофиламенти, които пронизват цялата цитоплазма и имат успореден на надлъжната ос на клетката ход.

3. Неврохимична характеристика на миентералните неврони

3.1. Неадренергична, нехолинергична трансмисия в ЕНС

По отношение на моторната трансмисия за ГИТ, нееднозначно е прието, че класическият и първостепенен невротрансмитер е ацетилхолин. Този факт е известен на науката още от края на деветнадесети век, когато се въвежда догмата, че за автономната нервна система са характерни два основни типа трансмисия: холинергична и адренергична (Langley 1903; Bayliss и Starling 1899). При експериментите си върху ЕНС Trendelenburg (1917) демонстрира, че възбудната трансмисия към чревната мускулатура се блокира почти напълно от атропин (широкоспектърен антагонист на мускариновите рецептори). Това наблюдение е напълно потвърдено от последвалите подобни изследвания, проведени както върху експериментални животни, така и върху човек (Fink 1959; Paton и Zar 1968). Освен това, в същата невронална популация имунохистохимично е доказано съдържанието на синтезиращия ензим холин ацетилтрансфераза, съкр. ChAT (Furness и съавт. 1983; Brookes и съавт. 1991). С други думи, първостепенното участие на ацетилхолина във възбудната трансмисия на ЕНС се приема за недвусмислено.

Не така стоят нещата по отношение на другата утвърдена трансмитерна система на автономната нервна система – адренергичната, концепциите за която претърпяват драматични промени през шейсетте години на двадесети век. На фона на относително ранното утвърждаване на ацетилхолина като основен възбуден

трансмита на ЕНС, в хода на проучванията са контрастирани значителни трудности при дефинирането на останалите използвани невротрансмитери (Campbell 1970; Furness и Costa 1973a; Makhoul и Grider 1993; Furness и съавт. 1995b). Въз основа на хипотезата, че основният възбуден трансмитер е ацетилхолин, по пътя на логиката много изследователи са смятали, че основният задръжен трансмитер следва да бъде катехоламин. Въпреки това, при провеждането на експерименти с антагонисти на норадренергичната трансмисия, веднага е станало ясно, че те не оказват почти никакво инхибиторно влияние върху чревната мускулатура (Burnstock и съавт. 1964, 1966; Campbell 1966). Така в този времеви период се поставят основите на схващането, че както задръжната, така и възбудната трансмисия в ЕНС се осъществяват от цяла система от невротрансмитери извън класическите ацетилхолин и катехоламини. По тази причина, с времето тези трансмитери се обединяват в термина неадренергична, нехолинергична трансмисия или NANC (англ.: Non-Adrenergic, Non-Cholinergic) трансмисия.

Въпреки че първите данни за съществуването на тази трансмитерна система датират от повече от петдесет години, и че на нея са посветени значителен брой публикации през този период, едва през последните десетилетия се наблюдава утвърждаване на много от първоначалните предположения. Съвременната концепция е, че NANC трансмитерната система включва редица медиатори, сред които NO, тахикинините, VIP и аденозин трифосфатът (АТФ). От функционална гледна точка, тази система е от изключителна важност, защото освен че осъществява част от възбудните и почти цялата съвкупност от инхибиторни рефлексии на ГИТ, тя участва и в регулацията на голям брой физиологични рефлексии, свързани с мотилитета като напр. отпускането на долния езофагеален сфинктер след преглъщане, релаксация на проксималната част на стомаха по време на хранене, или низходящите вълни от отпускане на чревната стена в резултат от разтягане.

При изследването и описанието на дадена система е от изключителна важност да се изготви единна и изчерпателна класификация на изследваната структура. В завършен вид такава е налична за NANC системата, но само от гледна точка на

нейния общ вид, т.е. за цялата автономна нервна система. От направения от нас обширен анализ на литературните данни обаче, бихме могли да направим заключението, че такава не е еднозначно изведена за NANC трансмисията в ЕНС.

Прави впечатление, че при немалка част от изследванията засягащи NANC системата, фокусът попада върху задръжната инервация на чревната мускулатура. По тази причина, като нейни основни представители са посочени NOS-, VIP- и АТР-съдържащите неврони на ЕНС. Това твърдение не е погрешно, тъй като мнозинството от NANC трансмитерите са въввлечени именно в инхибиторната трансмисия. По дефиниция обаче, в тази система би следвало да се включват всички трансмитери с изключение на ацетилхолина и катехоламините, т.е. необходимо е в нея да бъдат включени и трансмитерите, ангажирани и във възбудната трансмисия, например тахикинините. Не на последно място, в много ентэрални неврони се откриват, макар и в малки количества, редица други невротрансмитерни и невромодуляторни субстанции като 5-НТ, GABA, енкефалини и др., които по пътя на логиката, също следва да намерят място в ентэралната NANC система.

3.2. Аденозин трифосфат (АТФ)

Най-ранно в историята се осъществяват изследвания върху експресията на АТФ в ентэралните неврони (Burnstock и съавт. 1970; Burnstock, 1972). Основните аргументи за това са били факта, че при локалната му апликация, АТФ има сходно на съответната нервна стимулация въздействие върху чревната стена, и че негови крайни метаболити се отделят от интрамуралните нерви при тяхната стимулация (Rutherford и Burnstock 1978; McGonologue и съавт. 1996). Въпреки това, липсата на специфични антагонисти на мускулните рецептори за АТФ са довели до трудности при търсенето на специфични доказателства. Това се променя след провеждането на опитите с апамин, който не антагонизира действието на NO и VIP, а само на АТФ (Rand 1992; Sanders и Ward 1992). Данните от тези изследвания официално потвърждават АТФ като легитимен невротрансмитер в ЕНС.

3.3. Тахикинини

Понастоящем е известно, че след ацетилхолинът, като следващ основен невротрансмитер на възбудните мотоневрони трябва да бъдат посочени тахикинините, въпреки че възбудният им ефект е доказано по-нисък от този на ацетилхолина (Holzer и Holzer Petsche 1997). Първият потвърден тахикинин е субстанция Р или SP (Struder и съавт. 1973) и до 1985 г. той е бил изтъкван като единствен котрансмитер на ацетилхолина. По това време става ясно, че други вещества от същата група като неврокинин А, невропептид К и невропептид γ също участват във възбудната трансмисия. По тази причина, и въпреки че субстанция Р продължава да бъде най-изследвания представител на групата, понастоящем е по-правилно да се говори общо за тахикинини, а не за конкретни техни представители. Експерименталните доказателства, че тахикинините участват във възбудната невромускулна трансмисия са безспорни (Grider 1989; Lippi и съавт. 1998). Освен това, електронномикроскопски и имунохистохимично е доказано, че холинергичните и тахикининергичните неврони са част от една и съща клетъчна популация, т.е. налице е колокализация на тези два трансмитера (Llewellyn Smith и съавт. 1988; Brookes и съавт. 1991).

3.4. Вазоактивен интестинален пептид (VIP)

Обсъждането на VIP като трансмитер в ЕНС най-вероятно датира от седемдесетте години на двадесети век, когато имунопозитивни за този пептид влакна са открити в мускулатурата на различни отдели на ГИТ (Bryant и съавт. 1976; Larsson и съавт. 1976; Eklund и съавт. 1979; Fahrenkrug и съавт. 1978). Нещо повече, фармакологичните и денервационните експерименти ясно показват, че VIP-имунореактивните влакна принадлежат на собствени за ЕНС неврони, имащи подчертано инхибиторно за мотилитета въздействие. Интересен е също факта, че VIP всъщност е по-скоро основният представител на цяла група вещества, имащи еднаква функция, кодирани са от един и същ ген и въздействат върху общия рецептор VPAC (Grider и съавт. 1994; McConalogue и съавт. 1995). В тази група се

включват още PHI (англ. Peptide Histidine Isoleucine) и PACAP (англ. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide). По тази причина, в литературата често се употребява и термина VIP-семейство.

Друг официално признат факт е колокализацията на VIP и NOS в ентeралните невронални тела и варикозните аксонални разширения (Ward и съавт. 1992; Young и съавт. 1995). Този факт привежда допълнителни доказателства в потвърждение на хипотезата, че съществува една единна популация от инхибиторни мотоневрони в чревната мускулатура.

3.5. Азотен оксид (NO)

Последно в тази ретроспекция, но не и по важност, е доказването на NO като инхибиторен трансмитер (Rand 1992; Sanders и Ward 1992). NO е необичаен трансмитер, тъй като вместо да се натрупва в клетките, той се синтезира при необходимост след активация на синтезиращият го ензим, а именно невроналната изоформа на азотен оксид синтазата (nNOS). Първоначално, NO е описван като образуван от съдовия ендотел вазодилататор. Концепцията, че NO е съществен компонент от инхибиторната невротрансмисия на ЕНС датира от около тридесет години и се основава на наблюденията, че релаксацията на кучешкия илеоцекален отдел се дължи на водноразтворимо вещество, с характеристики и фармакодинамика на NO (Bult и съавт. 1990). През следващите години това се потвърждава от изследвания с апликация на екзогенен NO върху гладката мускулатура на опитни животни и хора, при които са наблюдавани същите ефекти (Dalziel и съавт. 1991; Thornbury и съавт. 1991). Относително по същото време се доказва, че NO се отделя от ентeрални *Dogiel* тип 1 неврони, в които е открит nNOS (Bredt и съавт. 1990; Ward и съавт. 1992). Съществуващият по това време дебат, че понастоящем утвърдените функции на NO всъщност се изпълняват от VIP, се решава няколко години по-късно с работата на Furness и съавт. (1995), с което NO официално се признава за първостепенния инхибиторен невротрансмитер в ЕНС.

Несъмнено голям тласък в развитието на познанията за тези неврони дава фактът, че nNOS-позитивните неврони показват висока активност и на ензима NADPH-диафораза (NADPH-d), т.е. те ефективно могат да бъдат локализирани както чрез имунохистохимия за nNOS, така и чрез ензимохистохимични реакции за доказване на NADPH-d (Dawson и съавт. 1991; Hope и съавт. 1991). Ясни данни за връзката на тези неврони с инхибиторната трансмисия могат да се открият в редица научни трудове (Costa и съавт. 1992; Ward и съавт. 1992; Barbiers и съавт. 1993; Timmermans и съавт. 1993).

За съжаление, резултатите от количествените анализи, касаещи nNOS-позитивните неврони в МС не са еднозначни. Nichols и съавт. (1992) например, съобщават че NO се открива при по-малко от 10% от невроналната популация в тънкото черво на морското свинче, докато Costa и съавт. (1992) откриват при сходни експериментални параметри nNOS при 20-25% от невроните.

Несъответствия съществуват и по отношение на проекциите на тези неврони. Повечето от публикуваните данни сочат, че проекциите им са изключително в анална посока (Costa и съавт. 1992; Furness 1994b). Nichols и съавт. (1992) обаче откриват проекции както в анална, така и в орална посока.

По отношение на клетъчната морфология, резултатите също са противоречиви. Furness и Costa (1987) и Furness (1994b) постулират, че по-голямата част от NOS-позитивните неврони са *Dogiel* тип 1, имащи единствено анално-насочени проекции. От друга страна, Nichols и съавт. (1992) описват *Dogiel* тип 2 морфология при по-голямата част от NOS-съдържащите неврони. Повечето автори обаче твърдо смятат *Dogiel* тип 2 невроните за аферентни (Bornstein и съавт. 1991; Song и съавт. 1991). Подобно на тях, Furness (1994b) не наблюдава NADPH-диафоразна активност или имунореактивност към NOS при нито един *Dogiel* тип 2 неврон. Той смята, че описаните от Nichols и съавт. (1992) находки най-вероятно се дължат на факта, че ламеларните дендрити на *Dogiel* тип 1 невроните са трудни за откриване при рутинно използваните микроскопски увеличения (до x400), а стават видими единствено при увеличения от порядъка на x1000.

4. Състояние на проблема

От направения литературен обзор се установи, че устройството на МС на ЕНС е изследвано при различни бозайници, включително при някои гризачи, но липсват достатъчно систематизирани морфологични и неврохимични изследвания при плъха. Независимо от експерименталния модел, фокусът на мнозинството от изследванията попада върху тънкото черво. Освен това, направените дотук изследвания са основани на работа върху *wholemout* препарати, които са информативни, но и често трудно приложими в практиката. Проучванията в областта на неврохимичната принадлежност на миентералните неврони при плъха са недостатъчни, а сравнителни изследвания върху разликите в експресията на трансмитерите в отделните части на коло-ректалната област (КРО) почти напълно липсват.

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

III. 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 установим 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 ентэралните 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 установените находки, да се направи комплексен анализ на неврохимичния профил на миентэралните неврони с акцент върху NANC трансмитерите, използвани от тях.

IV. 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. Експерименталните изследвания бяха осъществени в лабораторията на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология на Медицински университет – София. 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 експериментиране 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).

Плъховете Wistar са линия, получена при кръстосване на плъхове албиноси, принадлежащи към вид *Rattus norvegicus*. Тази линия е разработена през 1906 година в Wistar институт, за да послужи като модел-организъм за използване в биологични и медицински изследвания. Плъхът се явява най-широко използваното животно за биомедицински изследвания в Европа. Това е така поради безпроблемното снабдяване с колонии, отглеждани специално с тази цел, а също и поради спазване на етичните норми за поведение в науката и съпротивата от страна на организациите за защита правата на животните.

2. Хистологични техники

2.1. Рутинни оцветявания

2.1.1. 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 проведената дълбока анестезия, лявата сърдечна камера беше отворяна и канюлата беше въвеждана във възходящата аорта. Перфузионната фиксация се предшестваще от промиване на кръвоносната система с 0.05 М фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид (PBS) с рН 7.36 за около 5 min. Следващата стъпка беше включването на система с фиксатор, представляващ 4% разтвор на параформалдехид в 0.1 М фосфатен буфер с рН 7.2-7.4. Количеството на перфузионния разтвор за всяко от животните беше около 300 ml. След приключването на перфузията, дебелото черво на всички експериментални животни беше внимателно отпрепарирано от областта на сляпото черво до ануса. Така обособените мобилизирани сегменти бяха ексцизирани и щателно промити с физиологичен разтвор.

Чрез визуална инспекция бяха определени границите, разделящи четирите структурни сегмента на дебелото черво на плъха: проксимален колон, дистален колон, ректум и анален канал. От средната част на всеки от тези четири сегмента беше отрязано късче с дължина 1-1.5 cm. С цел постфиксация, така оформеният тъканен материал беше поставен в означени контейнери, съдържащи гореспоменатия фиксатор, и те бяха съхранени през нощта в хладилник (при 4°C). След окончателното приключване на фиксацията, материалът беше щателно промит с чешмяна вода, с цел отстраняването на остатъчното количество фиксатор.

Включването на материала в парафин изисква неговото предшестващо дехидратиране с помощта на редица от алкохолни разтвори с възходяща концентрация. Първоначално материалът беше поставен в 50% етанол за 2 h, след което беше прехвърлен в 70% етанол до следващия ден. Процедурата продължи с поставяне на материала в 80% етанол за 2 h, в 96% етанол на два пъти по 20 min и най-накрая в 100% етанол на два пъти по 15 min.

След окончателното му дехидратиране, материалът беше поставен в кедрово масло с цел просветляване. Този процес продължаваше докато тъканта придобие кехлибарен цвят и потъне на дъното на контейнера, което може да отнеме до няколко дни.

Процедурата на тъканна обработка продължаваше с пропиване в парафин, разтопен в термостат на 56°C, като това се извършваше трикратно за по 2 h. След приключването на процеса, материалът се включва цялостно в разтопен парафин, при охлаждането на който се оформя парафиново блокче.

2.1.2. Изготвяне на срезове и депарафиниране

Предвидените за изследването предметни стъкла преминаха през обработка с глицерин – белтък. Рязането на парафиновите блокчета беше извършено с помощта на парафинов микротом *Leica RM 2125 RTF*, чиято пластина беше стандартно ангулирана за движение в определен период. Дебелината на срезове беше настроена на 6 µm. Бяха изготвени серийни срезове, които бяха внимателно улавяни и пренасяни върху подготвените предметни стъкла. Поради относително малките размери на изследвания обект максимално 6 среза бяха монтирани на едно предметно стъкло.

Преди да се пристъпи към самото оцветяване, е необходимо тъканните срезове да бъдат депарафинирани. Това се осъществи чрез първоначално поставяне на предметните стъкла в кювети с ксилол на 2 пъти по 10 min и последващо преминаване през редица от алкохолни разтвори с низходяща концентрация. Последната включваше 100% етанол за 3 min, 96% етанол за 3 min; 80% етанол за 3 min и 70% етанол за 3 min. Процесът завърши с промиване на монтираните срезове с дестилирана вода за 5 min и леко подсушаване.

2.1.3. Оцветяване с хематоксилин и еозин (ХЕ)

Този метод е един от най-разпространените в хистологичната практика. Той позволява да се получи обща представа за състоянието на изследваната структура, благодарение на подходящото съчетание на прилаганите оцветители, отнасящи се към две противоположни групи – основни и кисели бои. Хематоксилинът е природна боя от растителен произход, която е разтворима във вода и спирт. Той притежава основни свойства в разтворено състояние и добре оцветява структурните компоненти на ядрата, поради високото съдържание на нуклеинови киселини в тях.

Еозинът е синтетична боя, също разтворима във вода и спирт, която притежава киселинни свойства, поради което оцветява клетъчната мембрана и цитоплазмата в розов цвят.

Оцветяването с ХЕ ние приложихме върху всички изследвани от нас сегменти на дебелото черво от всички експериментални животни. С това оцветяване целяхме да получим обща представа за нормалната морфология на изследваните структури в чревната стена и да открием евентуални участъци от нея с по-висока концентрация на чревни ганглии.

За успешното прилагане на методиката е необходимо предварителното изготвяне на двата оцветителни разтвори. За първият от тях се разтваря 1 g хематоксилин в 1 l дестилирана вода в топла среда. Към така получения разтвор се прибавят 0.2 g натриев или калиев йодат до пълното им разтваряне в него, добавят се 50 g калиево-алуминиева стипца, 50 g хлоралхидрат и 0.5 g лимонена киселина. За изготвянето на втория разтвор 1 g еозин се разтваря в 50 ml 70% спиртен разтвор.

Доведените до вода депарафинирани срезове бяха поставени за оцветяване в разтвора на хематоксилин за 7 min, след което се пристъпи към диференциране на базичните структури с хладка чешмяна вода за около 15-20 min. След това предметните стъкла с монтираните върху тях срезове бяха прехвърлени в разтвора на еозин за 10 min. След изплакване с дестилирана вода се пристъпи към диференциране с кратко потапяне на стъклата в две поредни кювети с 96° алкохол за по няколко секунди и накрая в кювета със 100° алкохол за 5 min. Процесът завърши с просветляване в ксилол и включване в ентелан.

2.1.4. Оцветяване по метода на *Nissl*

Оцветяването по *Nissl* е класически метод при обследването на нервната система поради силното багрене от боята на гранулирания ендоплазмен ретикулум (т.нар. Нислови грануляции). Фактът че оцветителят се не се натрупва или се натрупва слабо в околните тъкани позволява лесното локализиране на нервните клетки, както и контрастното открояване на периферните им части.

При този метод, депарафинираните и доведени до вода срезове бяха прехвърлени в 0.5% разтвор на крезил виолет (*Cresyl violet, Merck*) за 8-10 min, последвано от изплакване на срезовете с дестилирана вода за около 5 min. Процедурата продължи с диференциране в оцетнокисел спирт, представляващ 96° етанол с няколко капки ледена оцетна киселина, като процесът се контролира под микроскоп. След това се пристъпва към последователно поставяне на предметните стъкла в кювети с 96° и 100° алкохол. Процесът завърши с просветляване в ксилол и включване в ентелан.

2.1.5. Сребърна импрегнация по метода на *Gomori*

Сребърната импрегнация по *Gomori* е метод, използван в хистологичната практика за локализиране на ретикуларни влакна, често откривани в базалните пластинки.

При този метод, депарафинираните и доведени до вода предметни стъкла бяха подготвени за импрегнационната процедура чрез последователно поставяне в разтвор на калиев перманганат (KMnO_4) за 2 min, последвано от кратко потапяне в 1% разтвор на калиев метабисулфид ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), с цел спиране на предшестващата реакция. И двете стъпки бяха последвани от промиване с чешмяна вода за по 5 min.

Същинската импрегнация започна с поставяне на предметните стъкла в 2% желязоамониева стипца за 5 min, последвано от двукратното им промиване с чешмяна вода за по 2 min. След това стъклата бяха прехвърлени в т.нар. амонячно сребро за около 10 min. Последното се състои от 10% сребърен нитрат, 10% калиева основа и няколко капки амоняк и изисква последваща кратка промивка с дестилирана вода. Следващата стъпка беше поставяне на стъклата в 10% формалин до покафеняване на тъканта и последващо промиване с чешмяна вода за 5 min. Вирирането, възстановяването и стабилизирането на реакцията бяха извършени съответно чрез поставяне в 0.1% златен хлорид (AuCl) за 10 min, в 1-3% калиев метабисулфид ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) за 1 min и в 1% натриев тиосулфат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) за 5 min. Процесът завърши с промиване на монтираните срезове с чешмяна вода, алкохолно дехидратиране, просветляване с ксилол и включване в ентелан.

2.1.6. Оцветяване с витален оцветител (толуидиново синьо)

Оцветяването с толуидиново синьо също е с доказана ефективност при визуализацията на различни структури в нервната система. За тази цел депарафинираните и доведени до вода срезове се прехвърлят в 0.1% разтвор на толуидиново синьо в 2.5% разтвор на Na-карбонат за 5-10 min. Срезове се изплакват с дестилирана вода, след което се диференцират в 70° етанол докато се отбие излишната боя, като оцветяването се контролира под микроскоп. Следва дехидратиране, просветляване и включване в ентелан.

2.2. Сребърна импрегнация по метода на Golgi

Сребърната импрегнация по метода на *Golgi* е друга техника, използвана с голям успех при изследването на нервната система. Методиката се различава от рутинното изготвяне на препарати за светлинномикроскопско изследване поради необходимостта от специфична обработка на тъканта непосредствено след нейната фиксация. Това включва използването на два последователни разтвора. Първият от тях се състои от 6% калиев бихромат, 6% хлоралхидрат и 4% кисел формалин в обем не по-малък от 30 пъти от обема на тъканта. Материалът престоя в него 24 h, като за целта бе използвано тъмно шише със стъклена вата. След тяхното изтичане разтворът се подмени с нов и материалът беше оставен в него за още 24 h. Преди третирането с втория разтвор материалът беше промит за кратко с 0.75% разтвор на сребърен нитрат. Самият втори разтвор представлява 1 – 1.5% сребърен нитрат. В него материалът отново престоя два пъти по 24 h с междинно подновяване на разтвора.

Процесът продължи с щателно промиване на материала с дестилирана вода, дехидратация чрез серия от алкохоли с възходяща концентрация и парафиниране по описаната по-горе методика. Накрая от парафиновите блокчета бяха изготвени срезове с дебелина 30 μm . Върху тях беше приложено контраоцветяване с еозин, след което те бяха включени в ентелан.

3. Хистохимична реакция за доказване на NADPH-d

Поради известната колокализация на ензимите NADPH-d и nNOS, хистохимичното доказване на първия ензим успешно се използва в практиката за откриване на нитрергични неврони. За целта използвахме методиката на Scherer-Singler и съавт. (1983). При нея субстратът е β -NADPH, а контролните срезове бяха инкубирани в среда без субстрат.

Процедурата по вземането на материала е от голямо значение за хистохимичното демонстриране на ензимната активност. Целта е много бърза имобилизация на ензимите. Най-бързо това става чрез физична фиксация, в конкретния случай чрез замразяване на тъканта. По тази причина тъканният материал беше взет непосредствено след въвеждането на животните под наркоза. След това се пристъпи към рязане на криостатни срезове при температура -25°C , като избраната дебелина на срезовете беше $6\ \mu\text{m}$.

Пренесените и монтирани върху предметните стъкла срезове бяха оставени на въздух за подсушаване. След това те бяха промити за 5 min с 0.01 M PBS и бяха инкубирани в инкубационна среда в термостат при 37°C в продължение на 30 min. Самата 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 с pH 7.56. Срезовете бяха изплакнати в дестилирана вода, обезводнени в редица алкохоли с възходяща концентрация, просветлени в ксилол и включени в ентелан.

4. Имунохистохимични методи

4.1. Методика

За провеждане на имунохистохимичните реакции ние прилагаме ABC (авидин-биотин пероксидазен комплекс) техниката, съгласно Hsu и съавт. (1981). Инкубациите бяха извършени във влажна камера върху парафинови срезове с дебелина на срезовете $6\ \mu\text{m}$. Подготовката на материала и изготвянето на тъканните срезове беше извършено по аналогична на описаната при рутинните методики техника. За самите имунохистохимични реакции бяха използвани първични

Материали и методи

антисеруми/антитела (вж. Табл. 2), а реакциите бяха визуализирани чрез видовоспецифични биотинилирани вторични антисеруми (Табл. 3).

Поради комплексния характер на имунохистохимичната техника, ще представим последователно етапите на нейното провеждане. Тя е универсална и поетапно не се различава в зависимост от доказваните невроактивни вещества. Тъй като ние използвахме парафиновите срезове, първата стъпка на процедурата изисква тяхното депарафиниране и довеждането им до вода. Това беше постигнато чрез преминаване на монтираните върху хром-желатинирани предметни стъкла срезове през следните етапи:

1. Ксилол III – 5 min
2. Ксилол II – 5 min
3. Ксилол I – 5 min
4. Абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
5. 96% етилов алкохол – 2 min
6. 80% етилов алкохол – 2 min
7. 70% етилов алкохол – 2 min
8. Дестилирана вода I – 5 min
9. Дестилирана вода II – 5 min

Същинската имунохистохимична техника включваше следните стъпки:

1. Пермеабелизиране на срезове с 0.01 М PBS (рН 7.36), съдържащ 0.3% Triton X-100 (Merck) трикратно по 5 min, с цел подобряване на проникването на антитялото при последващата инкубация. При имунохистохимията за доказване на nNOS тази стъпка беше модифицирана по следния начин:
 - Промиване на срезове с 0.01 М PBS двукратно по 5 min;
 - Демаскиране на антигена с 0.01 М цитратен буфер (рН 6.0) за 30 min;
 - Промиване на срезове с 0.01 М PBS (рН 7.36) трикратно по 5 min.
2. Инхибиране на ендогенната пероксидаза с 1.2% водороден пероксид в абсолютен метанол, за 30 min, на стайна температура.
3. Промиване с 0.01 М PBS / 0.3% Triton X-100 за 15 min.

Материали и методи

4. Пермеабелизиране на срезове с 0.01 М PBS / 0.3% Triton X-100.
5. Преинкубация на срезове с 0.01 М PBS, съдържащ 5% нормален кози серум, за 1 h при стайна температура, с цел редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване.
6. Кратко двукратно промиване по 5 min с 0.01 М PBS / 0.3% Triton X-100.
7. Инкубация на срезове със съответните първични антисеруми (Табл. 2). Общото инкубационно време беше 24 h, в хладилник при 4°C.
8. Промиване на срезове с 0.01 М PBS (pH 7.36), трикратно по 5 min.
9. Инкубация със съответното второ (мостово) антитяло (Табл. 3). Инкубационното време беше 2 h при стайна температура.
10. Промиване на срезове с 0.01 М PBS (pH 7.36) трикратно по 5 min.
11. Инкубация на срезове в ABC комплекса (Vector Laboratories). Инкубационният разтвор беше приготвен 30 min преди употребата, като на 1 ml 0.01 М PBS добавихме 6.26 µl реактив А и 6.26 µl В. Инкубационното време беше 2 h, във влажна камера при стайна температура.
12. Промиване на срезове с 0.01 М PBS (pH 7.36), двукратно по 5 min.
13. Промиване на срезове с 0.05 М Tris / HCl буфер (pH 7.54) еднократно за 5 min.
14. Визуализиране на реакцията с хромоген 3,3'-диаминобензидин (DAB) на тъмно за 5 – 15 min 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).
15. Кратко промиване с 0.05 М Tris / HCl буфер.
16. Изплакване с дестилирана вода за 5 min.
17. Дехидратация с последователна редица от алкохоли с възходяща концентрация, а именно:
 - 1) 70° етилов алкохол за 2 min;

- 2) 80° етилов алкохол за 2 min;
 - 3) 96° етилов алкохол за 2 min;
 - 4) Абсолютен 100° етилов алкохол за 2 min.
18. Просветляване в ксилол двукратно по 10 min.
 19. Включване в ентелан (Merck).

4.2. Специфичност на антителата

За да тестваме специфичността на антителата, използвани в това проучване, ние използвахме положителни и отрицателни контроли. За контрол на специфичността на имунохистохимичната реакция ние проведохме паралелни реакции, при които специфичните първични антитела бяха пропуснати и заменени в инкубационната смес с PBS или с неимунен серум, при същото разреждане както съответния първичен антисерум. При тези условия ние не установихме специфично имунооцветяване. Освен това за тестване на специфичността на използваните антитела, ние използвахме преабсорбционни контроли, при които първичните антисеруми бяха преабсорбирани в продължение на 2 h на стайна температура или в продължение на 24 h при 4°C със съответния синтетичен антиген в концентрация от 20 до 200 µg/ml антисерум в работния разтвор. Последващото инкубиране на тъканния срез с подобен преабсорбиран антисерум доведе до отрицателен резултат (негативна контрола). Това е идеалния случай, при който абсорбционния тест може да се приеме като сигурна негативна контрола на имунохистохимичната реакция (Давидов 1982). Позитивните контролни реакции се осъществяваха чрез паралелно включване в инкубационната среда на срезове от други области, за които предварително е известно, че изявяват съответния антиген.

5. Обработка и анализ на изображенията

Препаратите бяха проучени и заснети с изследователски микроскоп Nikon Eclipse 80i (Japan), оборудван с цифрова камера DMX 1200с. 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 обработвани с цел регулиране на яркостта и контраста, както и отстраняване на наличните артефакти с помощта на Adobe Photoshop CS софтуер (Adobe System Inc., San Jose, CA).

6. 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 имунопозитивното оцветяване 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 мустаци“. Във всяка от кутиите, напречната линия представлява медианата, долната и горната им граница – съответно първият и третият квантил, а долният и горният мустак – съответно минималната и максималната стойност.

Данните са анализирани с помощта на тестът на *Kruskal-Wallis*, който е непараметрична алтернатива на еднофакторния дисперсионен анализ за съпоставка на три и повече групи (извадки). Тестът на *Kruskal-Wallis*, използва ранговете на наблюденията като се сравняват средноаритметичните стойности на ранговете за всяка група. 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 $p < 0.05$.

Експресията на изследваните невроактивни вещества в МС бяха обобщени в табличен вид на базата на полуколичествена оценка.

Таблица 2. Списък на първичните антисеруми, приложени при имунохистохимичните реакции:

Първични антисеруми Антиген	Снабдител	Гостоприемник/Тип	Разреждане
ChAT, PA1-4738	Thermo Fischer	Заяк/Поликлонално	1:100
АТФ-синтаза, LS-C74411	Life Span BioSciences	Мишка/Моноклонално	1:100
SP, ab67006	Abcam	Заяк/Поликлонално	1:1000
nNOS, PA1-38835	Thermo Fischer	Заяк/Поликлонално	1:50

Таблица 3. Списък на вторичните имунореагенти, приложени при имунохистохимичните реакции:

Вторични антисеруми Реагент	Снабдител	Работно разреждане
Кози, антизаешки IgG, биотинилиран, ab207995	Abcam	1:500
Кози, антимиши IgG, биотинилиран, BA-9200	Vector Laboratories	1:500

V. Собствени резултати

1. Общи съображения

Експерименталната дейност в това проучване е изцяло основана на обследването на срезове през чревната стена. Един от основните фактори, които следва да се вземат предвид при анализа на находките при тази методика е ориентацията на срезната равнина спрямо оста на червото или, по-конкретно, спрямо равнината на МС.

Работата със срезове дава задоволителна представа за особеностите както на МС, така и на всички елементи на чревната стена, с които той граничи. По този начин лесно се диференцират лигавицата, подлигавичния слой, мускулния слой и външната обвивка на съответния чревен сегмент. На срезове ясно се визуализират мускулните подслоеове, както и характерната ориентация на мускулните им влакна: вътрешен слой с циркулярен ход и външен 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.

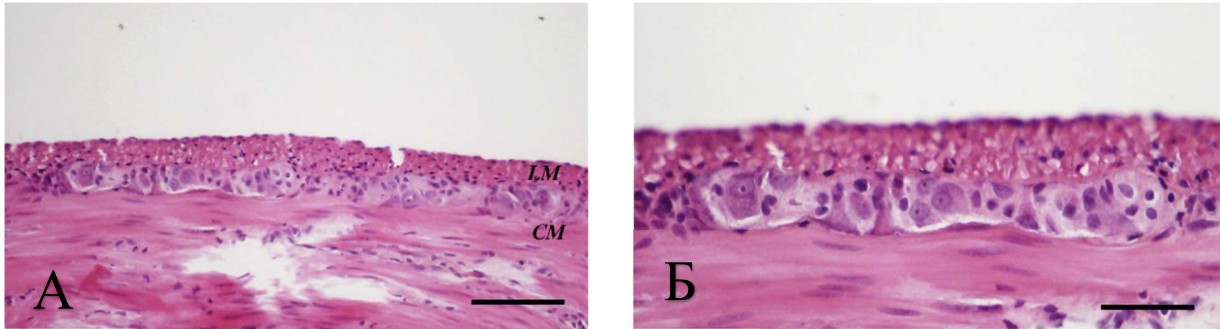
2. Неспецифични оцветявания

2.1. Оцветяване с хематоксилин и еозин (ХЕ)

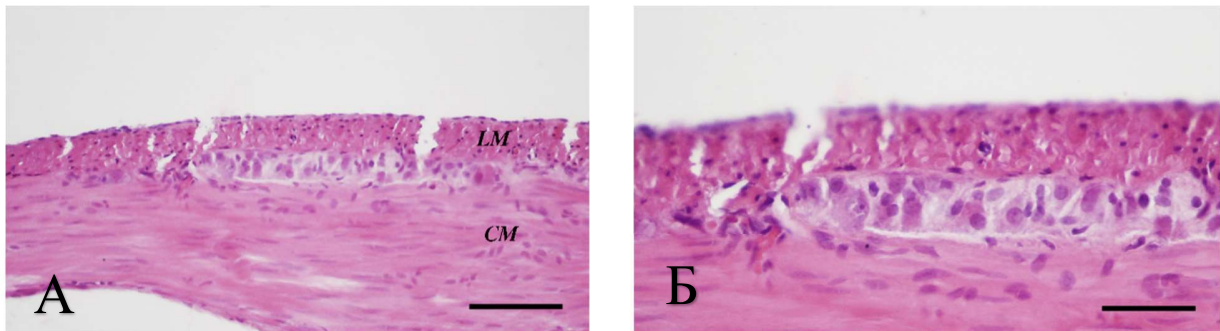
Рутинното оцветяване с ХЕ позволява послойното разглеждане на чревната стена и локализиране на МГ. Освен това, то дава обща представа за количествените и качествените характеристики на ганглийната система. С известни ограничения това оцветяване визуализира перикарионите като така позволява отдиференцирането 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 очаквано предостави различен изглед на мускулните влакна. На напречните срезове (фиг. 7-12), 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 (фиг. 13-25, 28-31)

Собствени резултати



Фигура 7. Оцветяване с ХЕ на напречен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

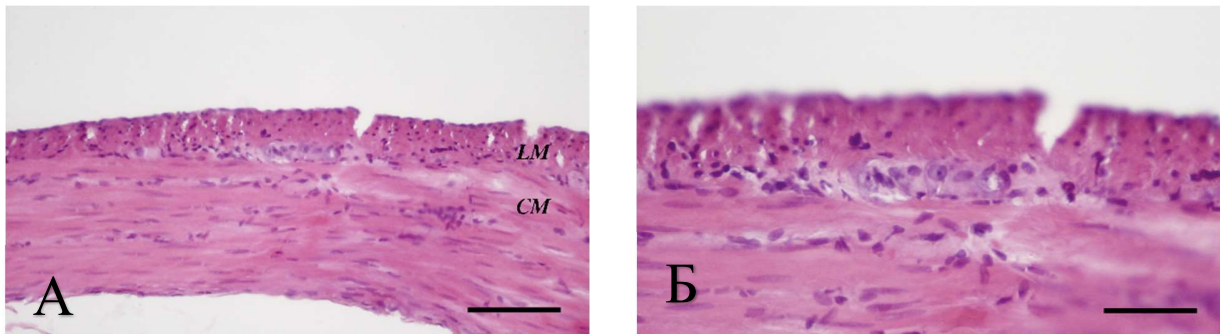


Фигура 8. Оцветяване с ХЕ на напречен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

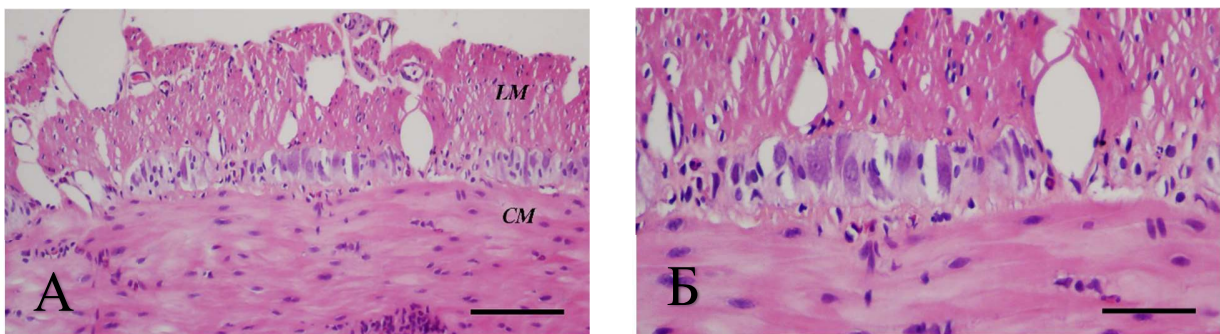
находките бяха реципрочни на описаните. При тангенциалните срезове дългата ос на мускулните влакна най-често се среща под прав ъгъл в областта на разположения между мускулните подслое МС (фиг. 25-27). Необходимо е стриктна диференцировка на тези слоеве, тъй като особено при увеличения от порядъка на $\times 400$, в зрителното поле не попадат останалите слоеве на чревната стена. Това може да доведе до погрешното им определяне и до неправилна последваща интерпретация на находките.

Изготвените от нас препарати обхваща цялата КРО: проксимален колон (фиг. 7,8, 12-21), дистален колон (фиг. 9, 22-24), ректум (фиг. 10-11, 25-28) и анален канал (фиг. 12, 29-31). Във всички отдели МГ показаха сходни морфологични особености. Освен това не открихме съществени визуални различия в структурата им при

Собствени резултати



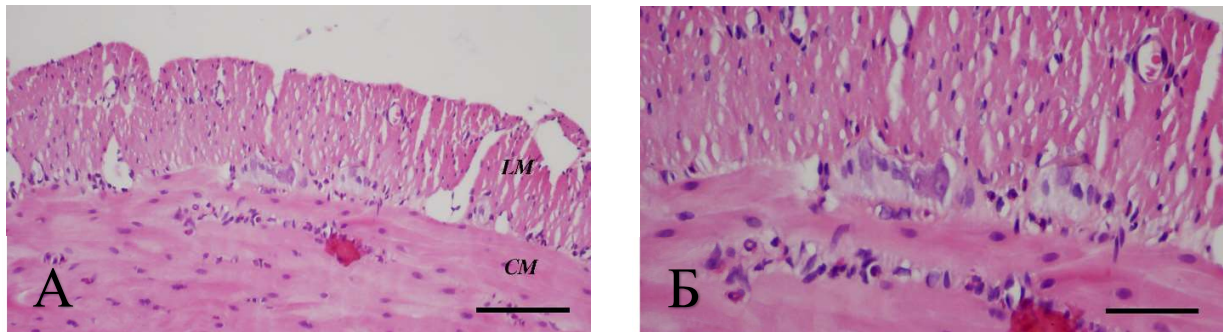
Фигура 9. Оцветяване с ХЕ на напречен срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



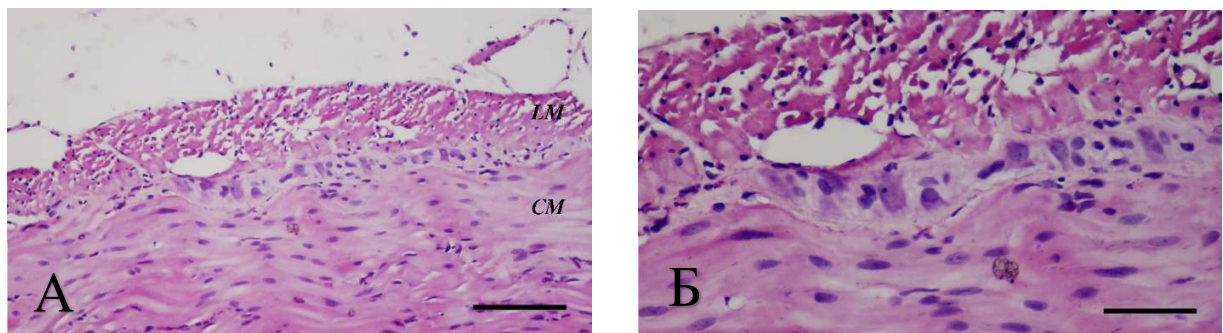
Фигура 10. Оцветяване с ХЕ на напречен срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

различната ориентация на срезовете. Те бяха разположени в ограничени разширени пространства между мускулните подслое, т.е. строго в граничната област между ЦМП и НМП. Не установихме те да отделят мускулно-клетъчна маса от единия слой и да я „прибавят“ към другия. Тънкият слой съединителна тъкан, който се установяваше между двата мускулни подслоя директно продължаваше, подобно на капсула, в периферията на ганглиите. Интересно е да се отбележи, че тази капсулоподобна структура в никакъв случай не беше добре оформен 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.

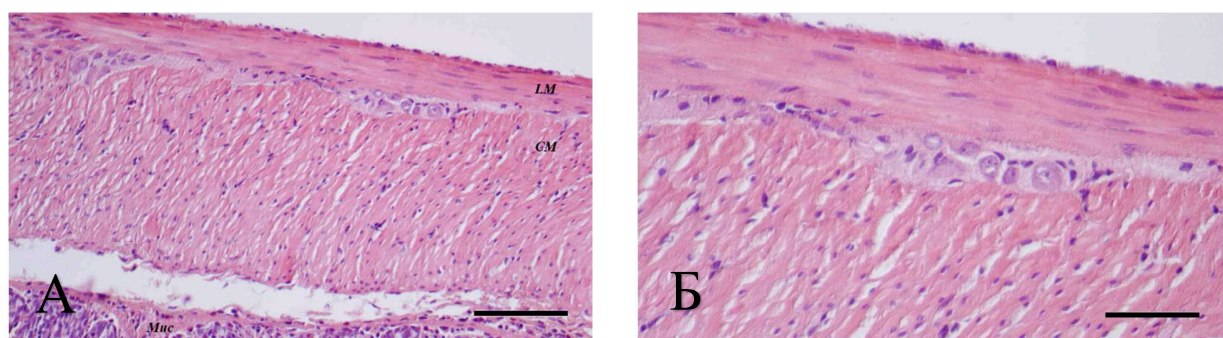
Собствени резултати



Фигура 11. Оцветяване с ХЕ на напречен срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

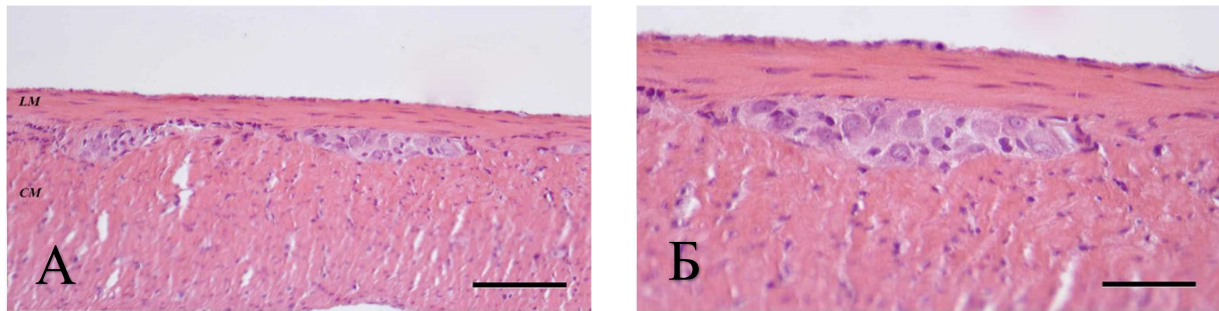


Фигура 12. Оцветяване с ХЕ на напречен срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

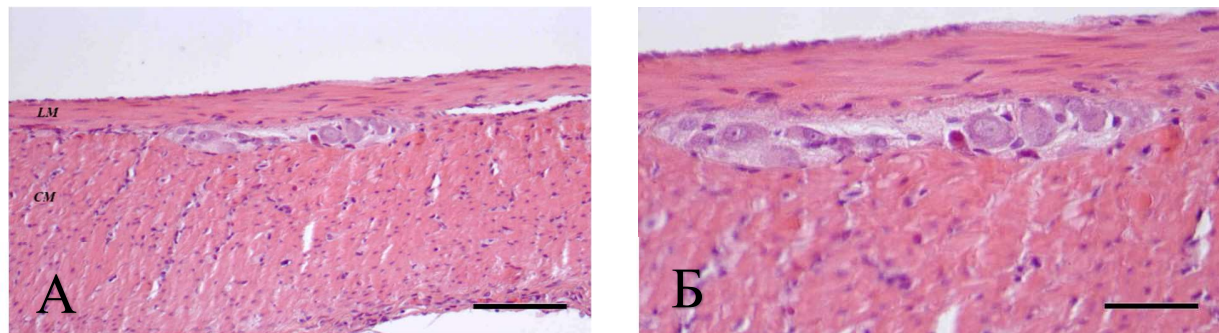


Фигура 13. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

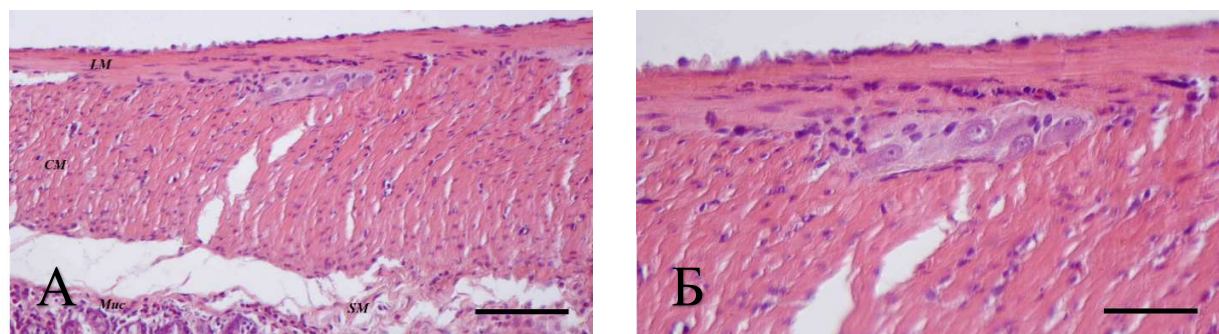
Собствени резултати



Фигура 14. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

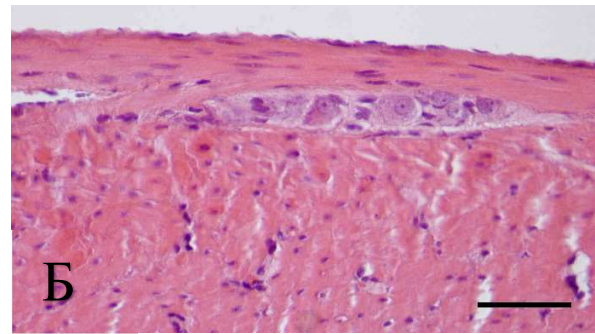
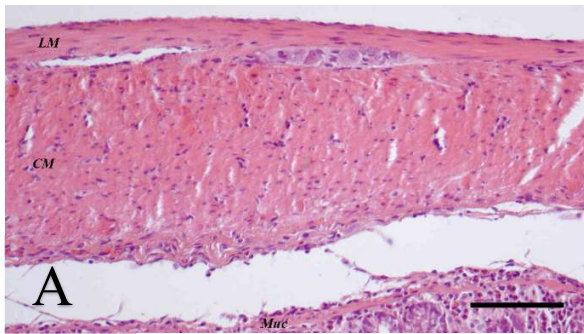


Фигура 15. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

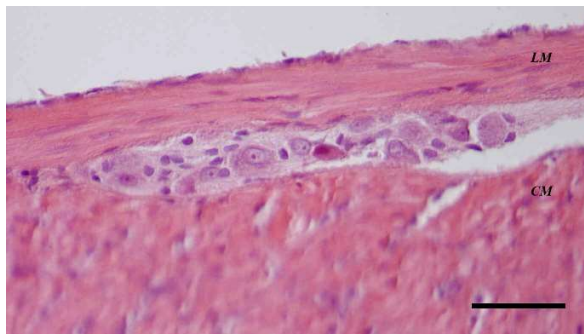


Фигура 16. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

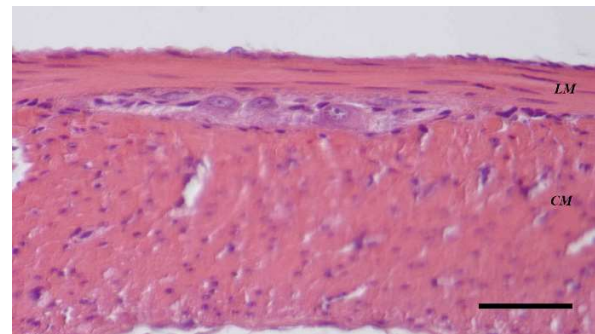
Собствени резултати



Фигура 17. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .



Фигура 18. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: 50 μm .



Фигура 19. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: 50 μm .

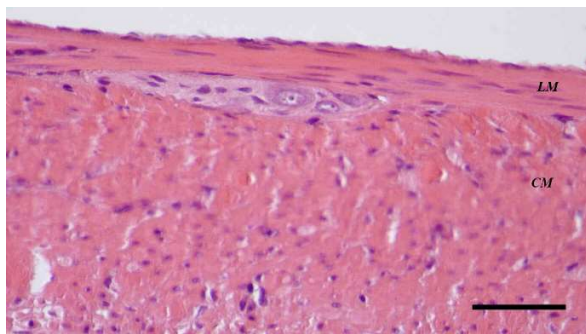
Техните ядра бяха малки и хетерохромни. По тези причини ганглиите по-скоро изглеждаха лишени от собствена капсула и визуално бяха разположени сред рехавата съединителна тъкан, разделяща двата мускулни слоя.

Наблюдаваните от нас ганглии имаха твърде вариабилни размери. По визуална оценка, най-големите от тях надхвърляха 500 μm по дългата си ос. Формата на всички от тях 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. Въпреки това, от тях несъмнено невроните бяха числено малцинство.

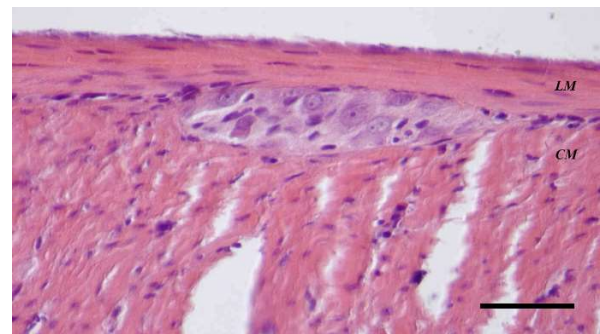
Собствени резултати

Само при извънредно малък брой ганглии установихме наличие на повече от един неврон по късата ганглийна ос.

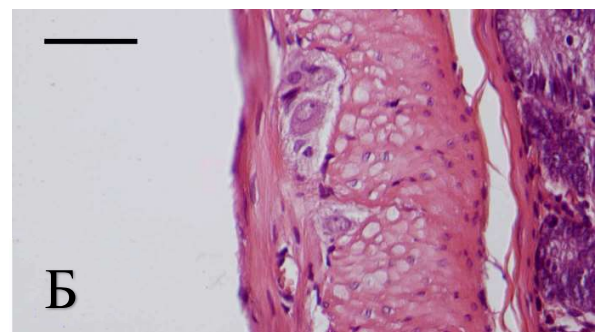
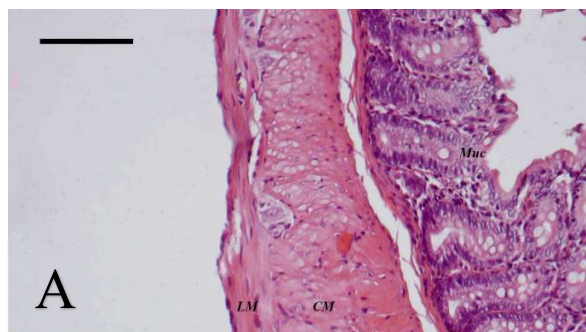
Във вътрешността на ганглиите открихме три основни структурни елемента – невронални тела, глиални елементи и снопове от влакна. Невроналните тела съдържаха присъщата за тях гранулирана, базофилна цитоплазма. Техните ядра бяха относително големи, окръглени и хипохромни, често с ясно отграничимо ядръце.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



Фигура 20. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

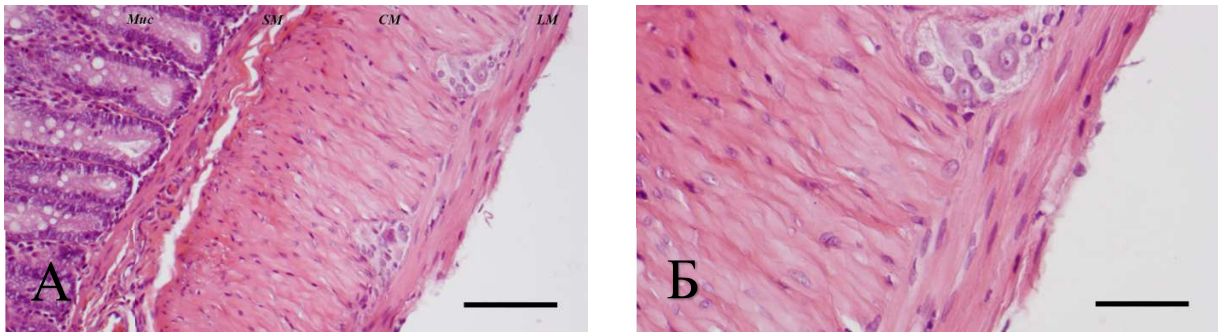


Фигура 21. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

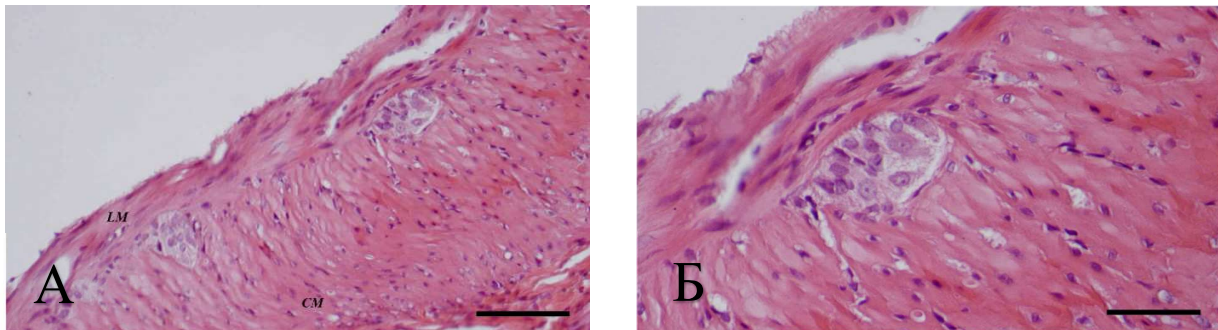


Фигура 22. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

Собствени резултати



Фигура 23. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



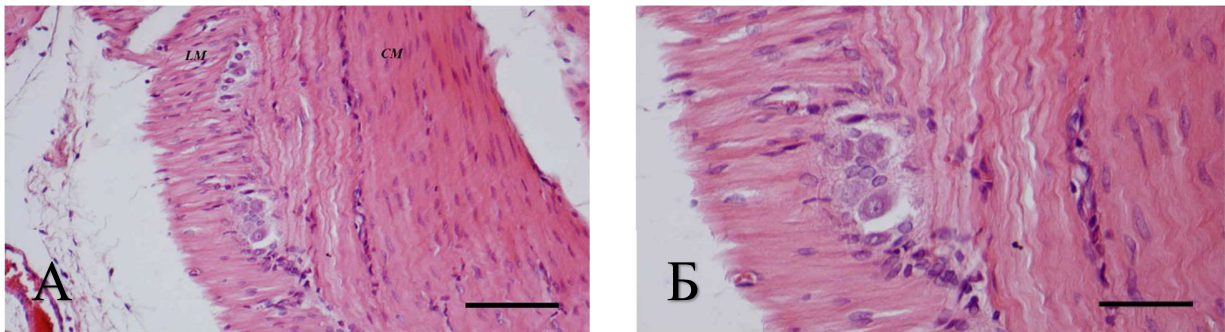
Фигура 24. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

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

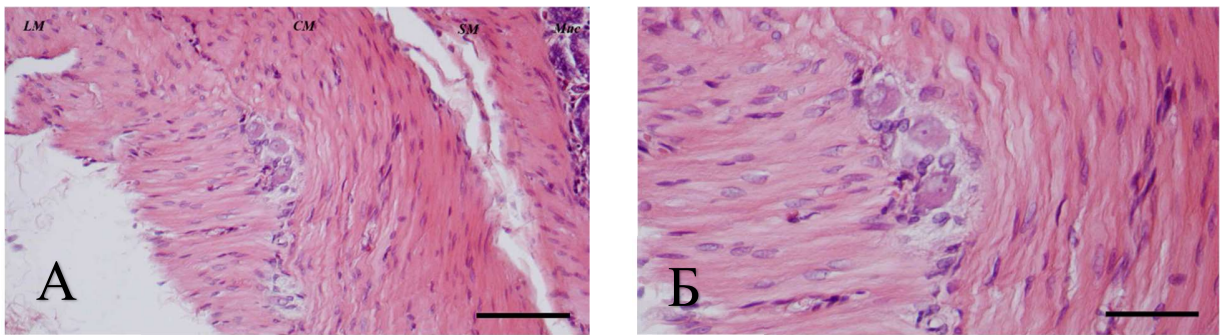
Пространството между клетъчните елементи в ганглиите беше запълнено с рехаватъчен, често имаща фибриларен характер. Не установихме наличие на миелинизирани влакна с присъщия за тях облик.

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

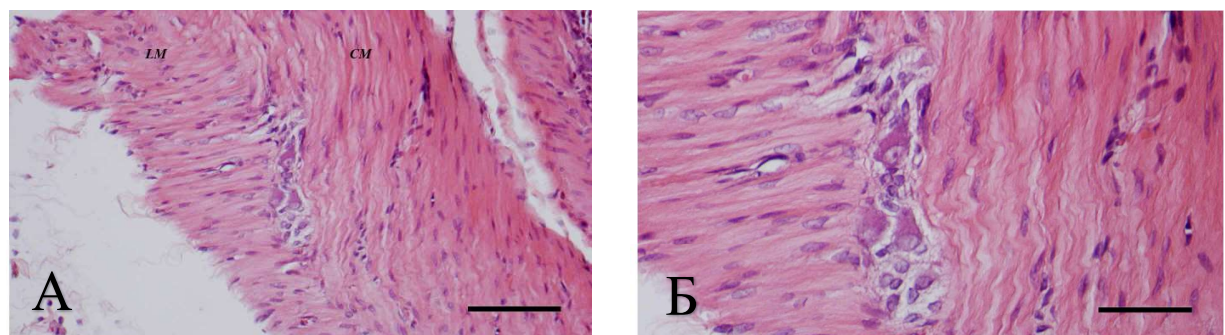
Собствени резултати



Фигура 25. Оцветяване с ХЕ на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

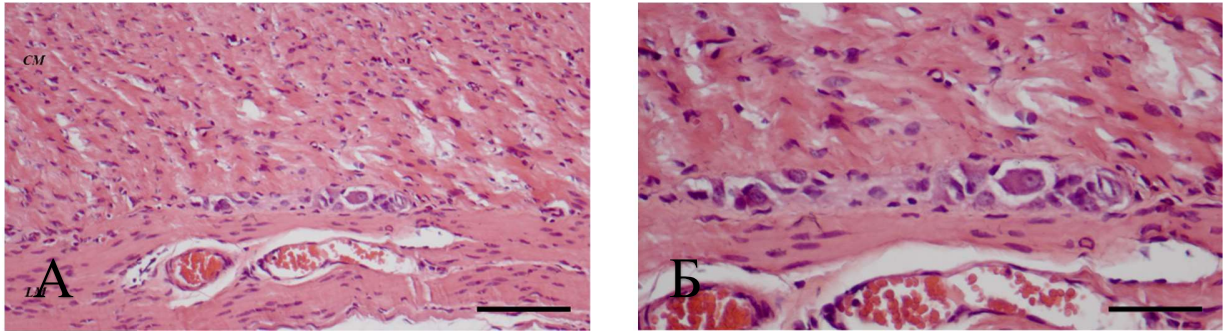


Фигура 26. Оцветяване с ХЕ на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. SM – подлигавичен слой СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

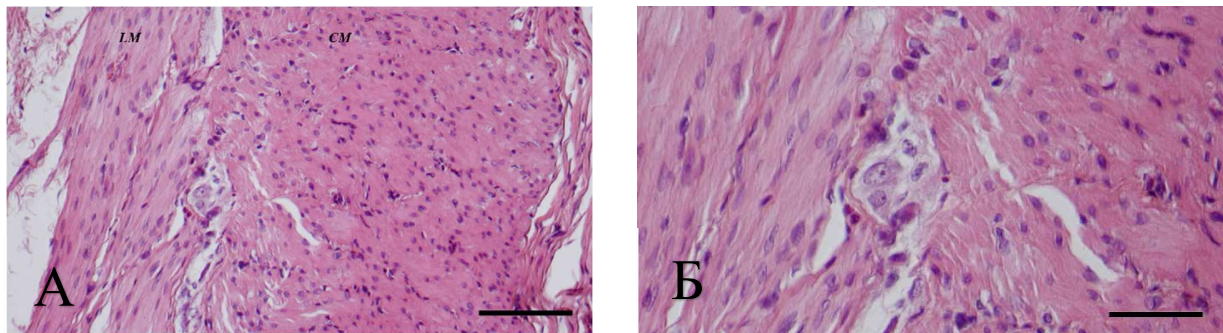


Фигура 27. Оцветяване с ХЕ на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

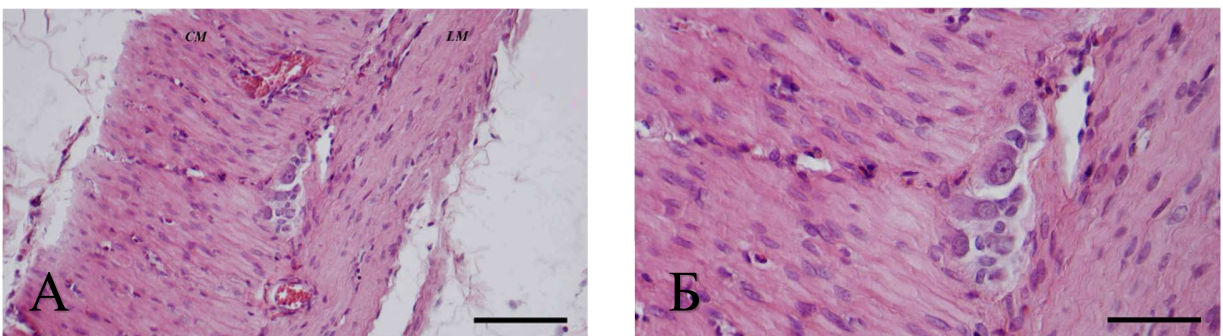
Собствени резултати



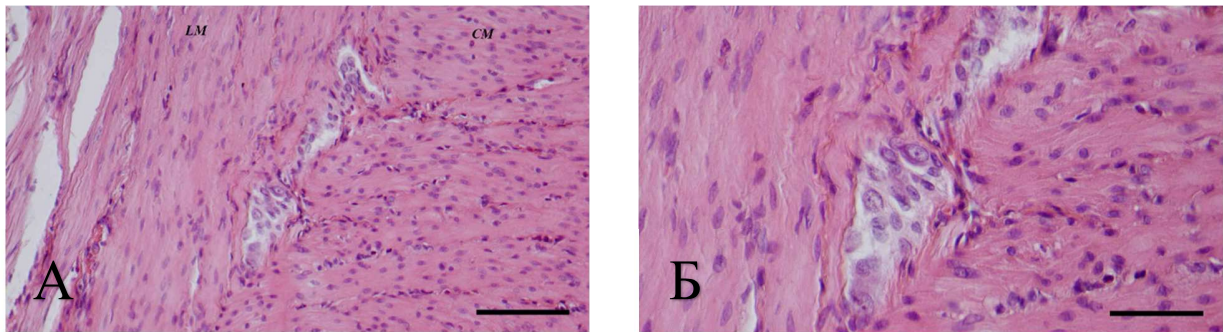
Фигура 28. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Фигура 29. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



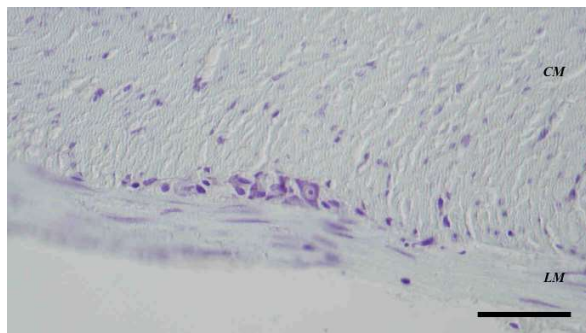
Фигура 30. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



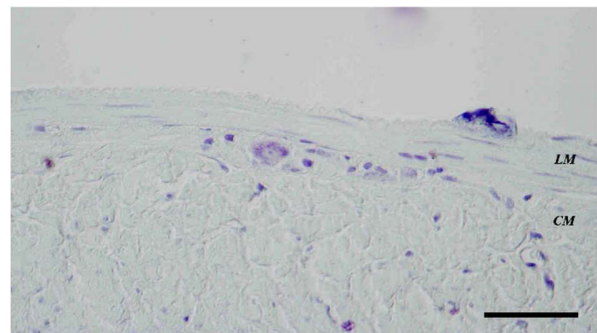
Фигура 31. Оцветяване с ХЕ на надлъжен срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя.. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

2.2. Оцветяване по Nissl

За изследване на морфологията на невроните, които участват в образуването на МГ, ние използвахме оцветяване с кризил виолет по *Nissl*. Това оцветяване е удачно за тази цел, защото клетъчните контури контрастно се открояват от околните структури. Това е така защото гранулирания ендоплазмен ретикулум на невроните (т.нар. Нислови грануляции) се оцветява интензивното от боята. Поради негативната реакция на ядреното съдържимо към оцветителя, контурът на ядрото също става ясно различим.



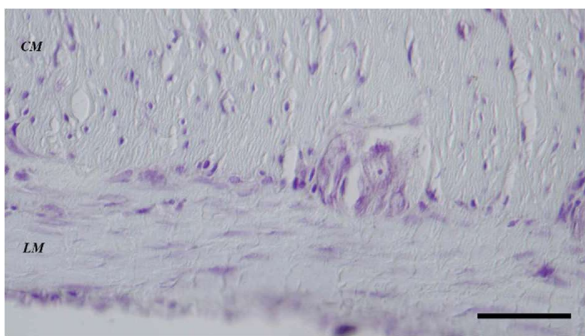
Фигура 32. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ т.



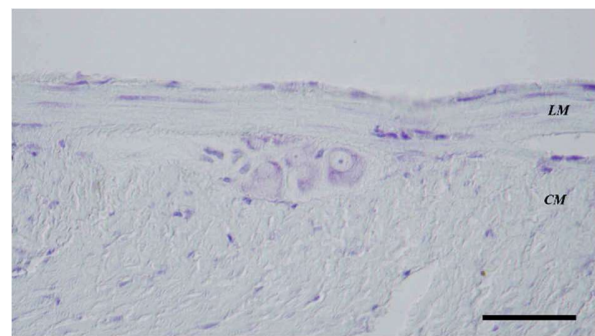
Фигура 33. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ т.

Собствени резултати

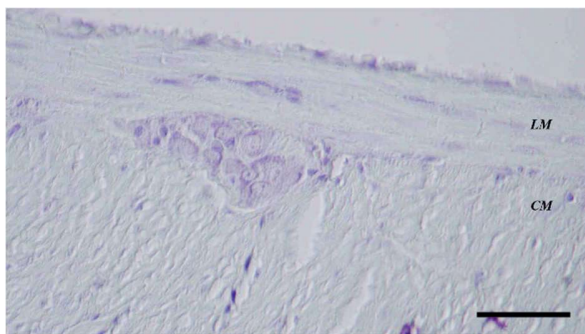
Представените препарати са от областта на проксималния (фиг. 32-37) и дисталния (фиг. 38-40) колон. Преобладаващата част от наблюдаваните неврони бяха с окръглена или неправилна форма. По-малка част от невроните бяха с триъгълна или многоъгълна форма. При някои от тях, на късо протежение спрямо перикариона можеха да се проследят оцветени и добре отграничени дендритни израстъци. Невроналната цитоплазма имаше фино гранулиран вид от Нисловите грануляции. Ядрата бяха неочветени; формата им беше кръгла, а контурите – ясно



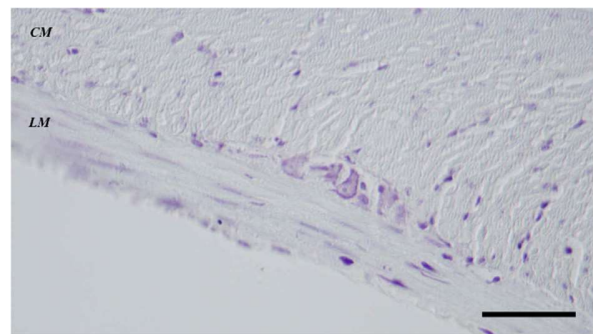
Фигура 34. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 35. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

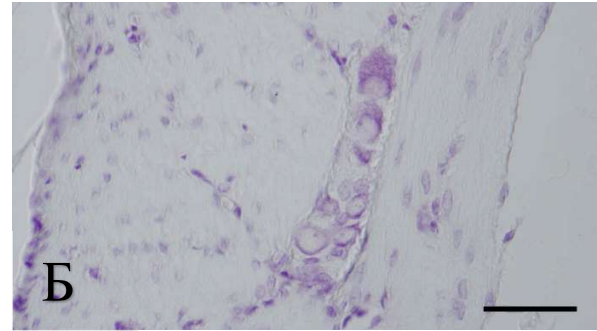
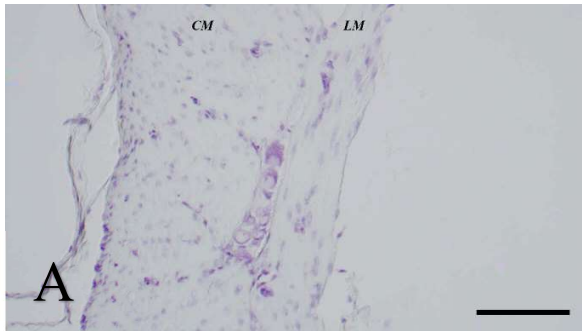


Фигура 36. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

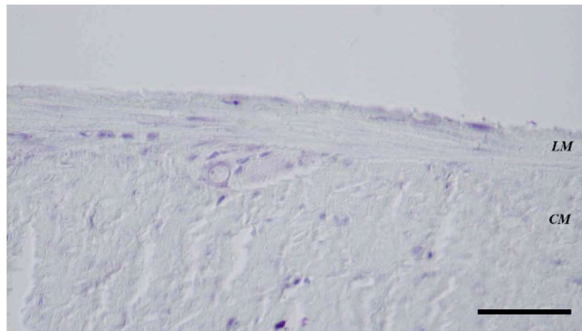


Фигура 37. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

Собствени резултати



Фигура 38. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 39. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от дистален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 40. Оцветяване по Nissl на надлъжен срез от дистален колон на плъх на голямо увеличение. Наблюдава се МГ в областта между двата мускулни слоя. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

очертани. Наблюдаваше се добре оформено ядрце с интензивна реакция на оцветяване.

На препаратите добре се открояваха малките, издължени ядра на ентералната глия, поради силното натрупване на боя в тях. Пространствата между клетките 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 показваха среден интензитет на оцветяване. Поради

подчертания афинитет на оцветителя към Нисловите грануляции, пигментирани влакна в мускулните подслоеве не се установиха. Външната морфология и физическите характеристики на визуализираните с този метод ганглии, вкл. форма, размери, клетъчен брой и др. не се различаваха от тези при рутинното оцветяване с ХЕ.

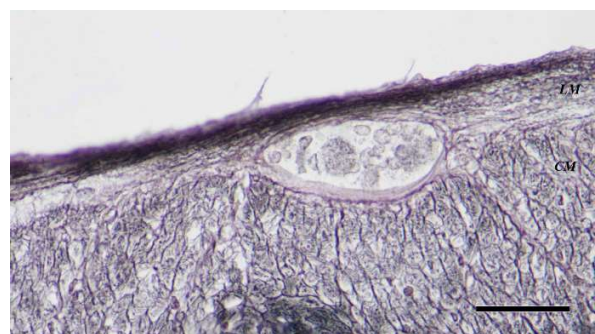
2.3. Сребърна импрегнация по Gomori

Тази методика често се използва в хистологичната практика за визуализация на ретикуларни влакна. Тя беше приложена от нас върху срезове през чревната стена с цел да бъдат изследвани характеристиките на наличната съединителна тъкан около и вътре в ганглиите. Препаратите са изготвени от областта на проксималния (фиг. 41-45) и дисталния (фиг. 46-50) 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, 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

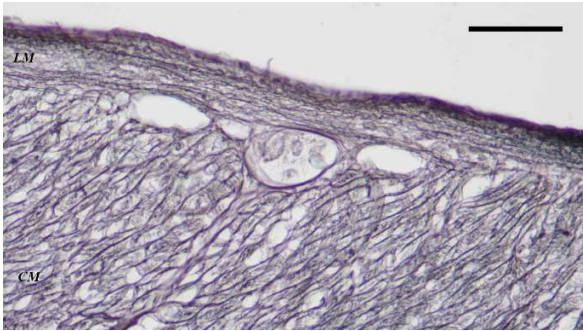


Фигура 41. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Gomori на надлъжен срез от проксимален колон на голямо увеличение. SM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 42. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Gomori на надлъжен срез от проксимален колон на голямо увеличение. SM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

Собствени резултати



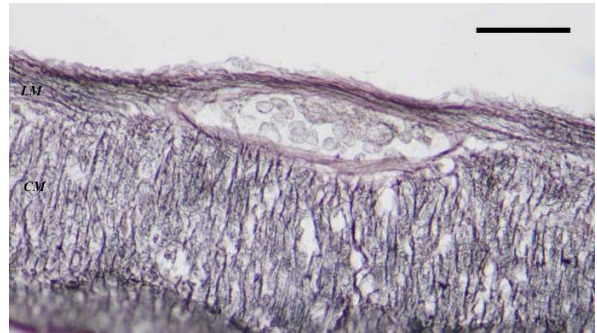
Фигура 43. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Gomori на надлъжен срез от проксимален колон на голямо увеличение. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 44. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Gomori на надлъжен срез от проксимален колон на голямо увеличение. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 45. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Gomori на надлъжен срез от проксимален колон на голямо увеличение. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



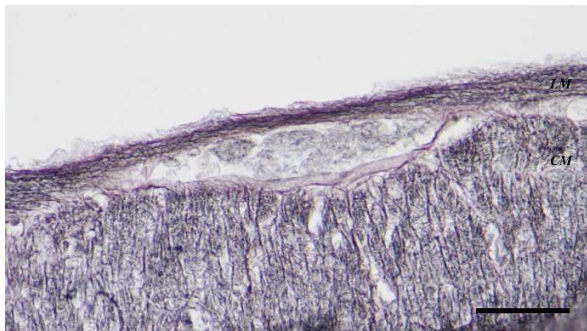
Фигура 46. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Gomori на надлъжен срез от проксимален колон на голямо увеличение. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

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.

Собствени резултати

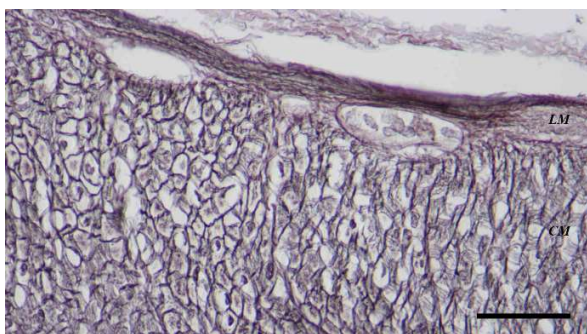
В обобщение, така описаните структури наподобяваха базална ламина с високо съдържание на ретикуларни влакна, разделяща двата мускулни слоя. В областта на МГ тя се разцепва и ги обвива. На тези места тънката пластинка от влакна беше с по-голяма дебелина.



Фигура 47. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Готогі на надлъжен срез от дистален колон на голямо увеличение. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 48. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Готогі на надлъжен срез от дистален колон на голямо увеличение. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.



Фигура 49. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Готогі на надлъжен срез от дистален колон на голямо увеличение. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

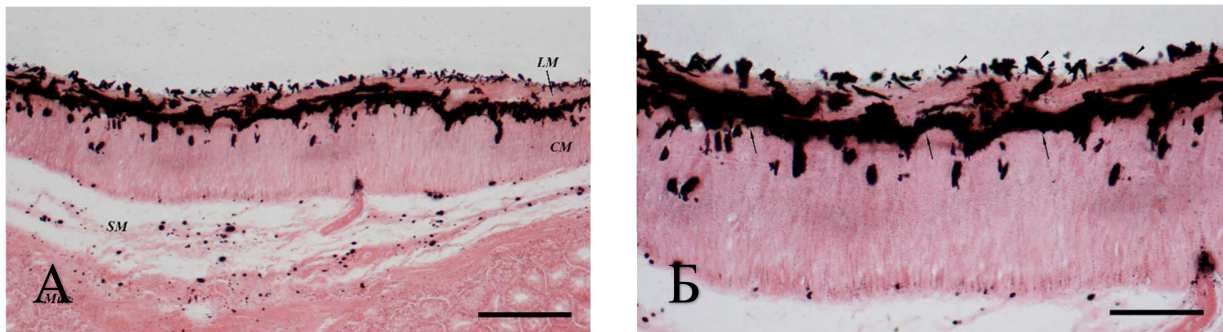


Фигура 50. Ретикуларни влакна в периферията на МГ, визуализирани чрез оцветяване по Готогі на надлъжен срез от дистален колон на голямо увеличение. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: 50 μ m.

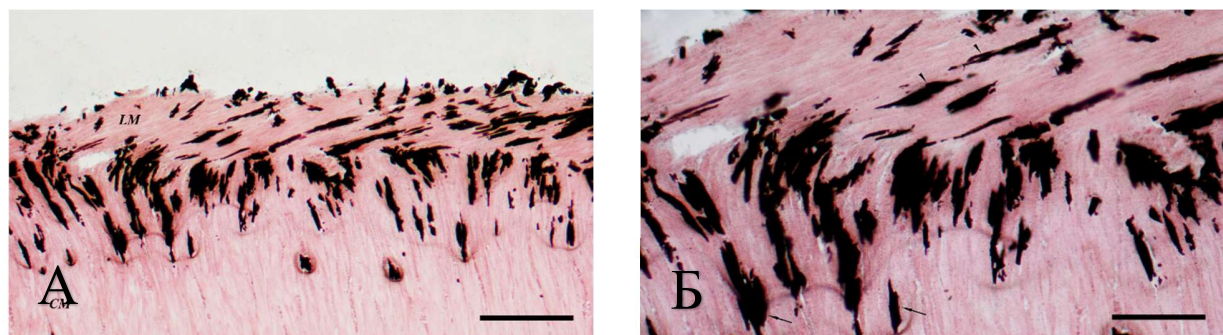
2.4. Сребърна импрегнация по Golgi

Друг метод на оцветяване, който често се използва в практиката за визуализация на нервни елементи е сребърната импрегнация по Golgi със сребърен нитрат. Широкото приложение на метода се основава на високия афинитет на среброто към плазмените мембрани на невроните и глията. Представените препарати са от областта на проксималния (фиг. 51, 52) и дисталния (фиг. 53, 54) колон.

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

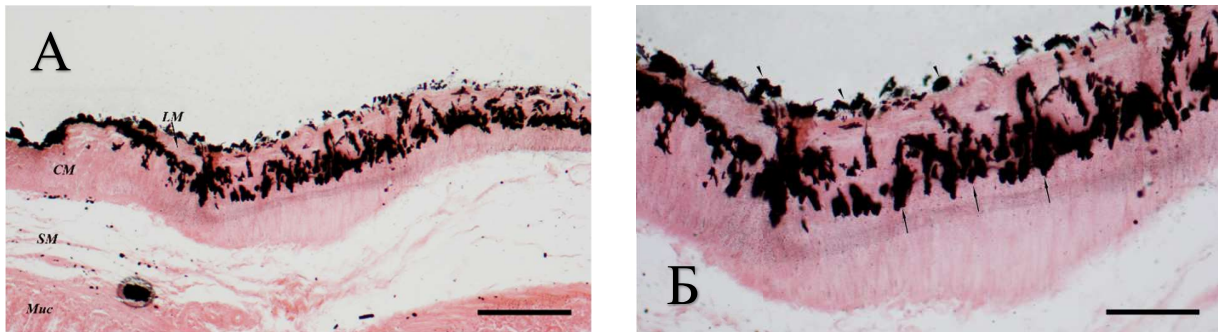


Фигура 51. Нервни структури в МС и околните мускулни слоеве, визуализирани с помощта на сребърна импрегнация по Golgi на надлъжен срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Със стрелки е посочен МС, а с глави на стрелки – струпвания от нервни елементи в субсерозния сплит. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

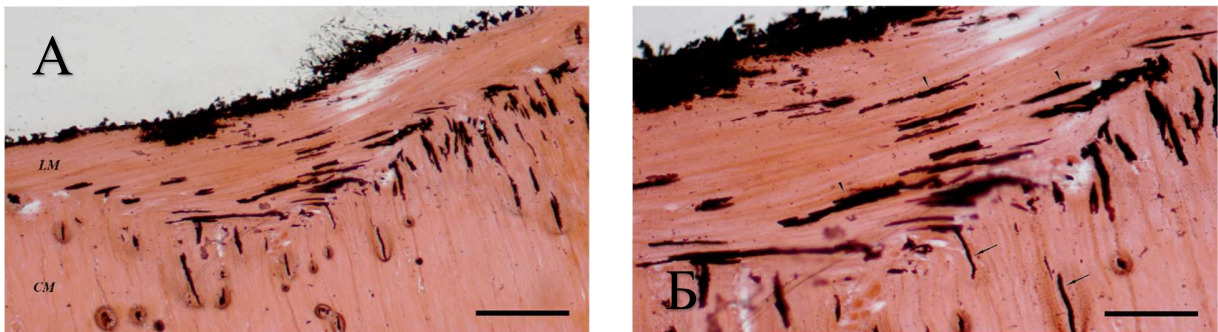


Фигура 52. Нервни структури в МС и околните мускулни слоеве, визуализирани с помощта на сребърна импрегнация по Golgi на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се снопове от нервни влакна в ЦМП (стрелки) и в НМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

Собствени резултати



Фигура 53. Нервни структури в МС и околните мускулни слоеве, визуализирани с помощта на сребърна импрегнация по Golgi на надлъжен срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо увеличение (Б). С глави на стрелки са посочени сгъстявания от нервни елементи в субсерозния сплит. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Фигура 54. Нервни структури в МС и околните мускулни слоеве, визуализирани с помощта на сребърна импрегнация по Golgi на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо увеличение (Б). Наблюдават се снопове от нервни влакна в ЦМП (стрелки) и в НМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

възможност за ясно отграничаване на всички слоеве 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 непрекъснатата 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 (фиг. 51). В другата конфигурация наблюдавахме

Собствени резултати

плексуса като отделни, хомогенно оцветени в черно образувания, с неправилна форма и неравни контури (фиг. 53). Описаните варианти на визуализация бяха наблюдавани при всички изследвани области и възможни ориентации на среза.

Независимо от конкретния тип на презентиране на сплита, честа находка на всички изготвени препарати бяха отделни обособени импрегнирани структури в ЦМП и НМП. На надлъжните срезове (фиг. 51, 53) те представляваха овални телца, разположени в подчертана близост до МС. На тангенциалните срезове (фиг. 52, 54) 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. При мнозинството от препаратите визуално не отчетохме преобладаване на споменатите образувания в някой от двата подслоя.

При част от хистологичните препарати, оцветяване в мускулните подслоеве привидно липсваше. Въпреки това, при тях както и при всички останали препарати, на голямо увеличение (x400) 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 линии, успоредни на мускулните влакна.

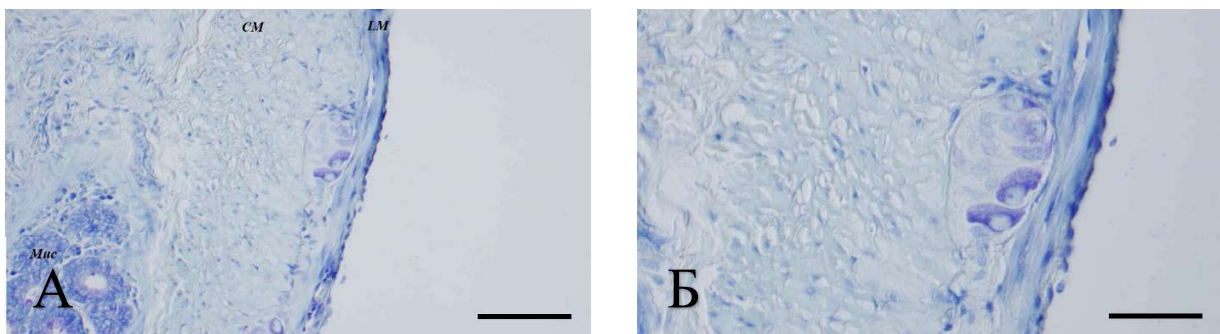
Отчетлива находка, наблюдавана на всички изготвени препарати, беше значителното натрупване на аргирофилни структури по външната повърхност на НМП. На част от препаратите, то беше организирано в отделни образувания с неправилна форма и неравни контури (фиг. 51-53). В други участъци, оцветените структури имаха непрекъснат характер, също с неравни контури. От тях започваха дървовидно разклонени фини влакнести структури, разклоняващи се извън пределите на чревната стена (фиг. 54).

При по-обзорните фотомикрографски изображения, на които присъства и подлигавичния слой, в последния също се наблюдаваха оцветени структури, макар и в по-оскъдно количество (фиг. 51, 53). Най-често те бяха с овална форма, поединично или в малки групи. Освен тях, честа находка бяха и единични оцветени телца с овална или неправилна форма на границата между ЦМП и субмукозата.

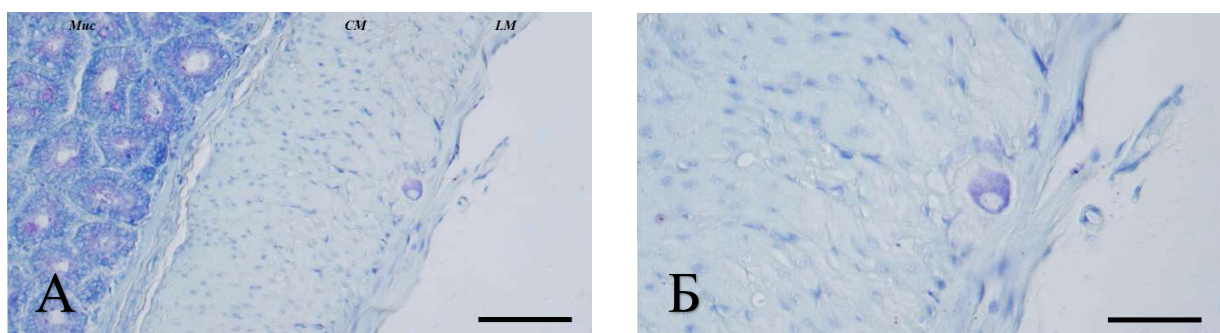
2.5. Оцветяване с толуидиново синьо

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.

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

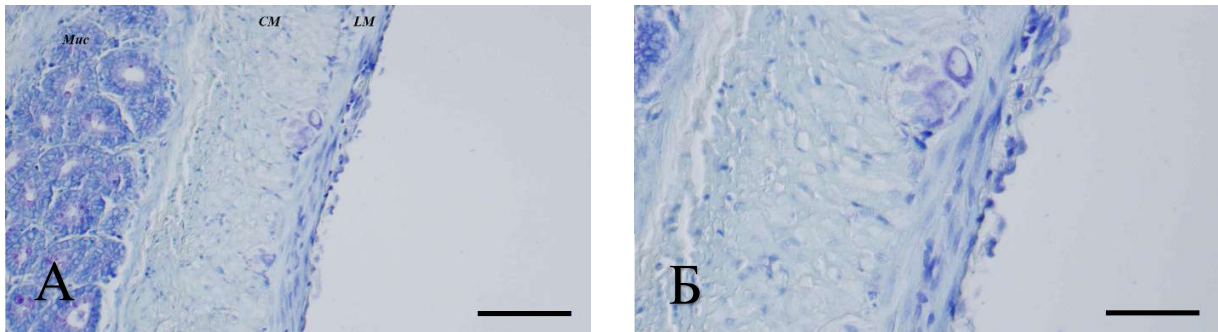


Фигура 55. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

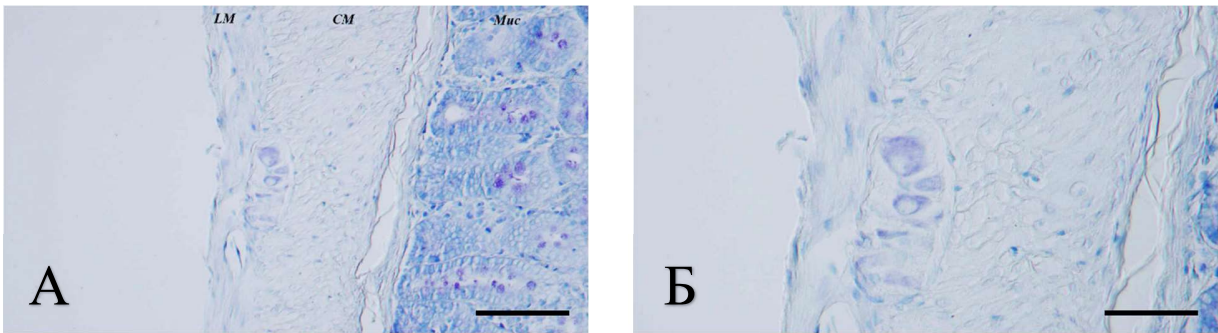


Фигура 56. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

Собствени резултати



Фигура 57. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .



Фигура 58. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Мис – лигавица, СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

лигавичните жлези и ентералните нервни елементи, определянето на границите на слоевете на чревната стена не представляваше трудност. Поради наличието на пигментирани неврони, МГ бяха различни, но не показваха отчетливо оцветени контури спрямо околните мускулни подслоеве. Представените препарати са от областта на проксималния (фиг. 55-58) и дисталния (фиг. 59-61) колон.

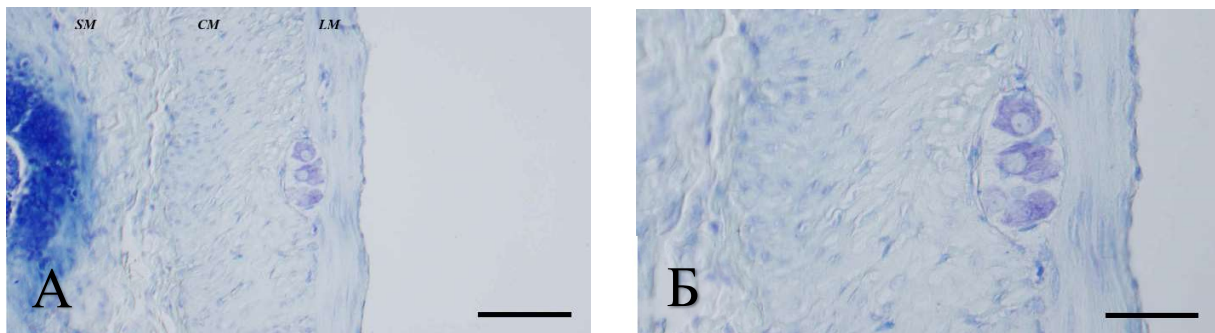
Цитоплазмата на миентералните неврони имаше фино гранулиран вид, оцветена с нативния за оцветителя тъмносин цвят. Формата на наблюдаваните перикариони беше неправилна, с множество израстъци, наподобяваща мултиполарна морфология. Клетъчните контури бяха ясно отчетливи, контрастиращи на оптически празния фон. Типичните за невроните еухромни ядра бяха неочветени или слабо оцветени, с кръгла форма и относително големи размери, а ядърцето е ясно откриво поради интензивното си оцветяване. Макар и

Собствени резултати

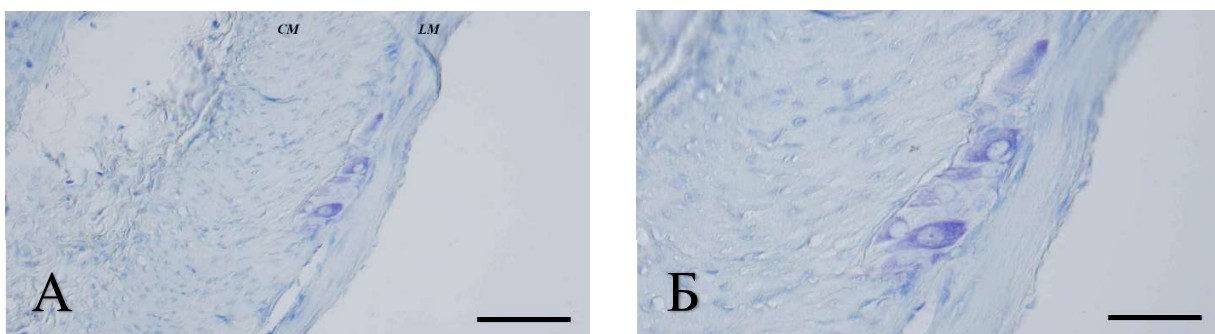
неоцветени, около невроните се различаваха контурите на други неоцветени клетки със значително по-малки размери.

На част от препаратите се наблюдаваше интензивно оцветена влакнеста структура по външната повърхност на НМП, отговаряща по положение на субсерозния сплит (фиг. 55, 57). Освен това за отбелязване е, че 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. 55-59).

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

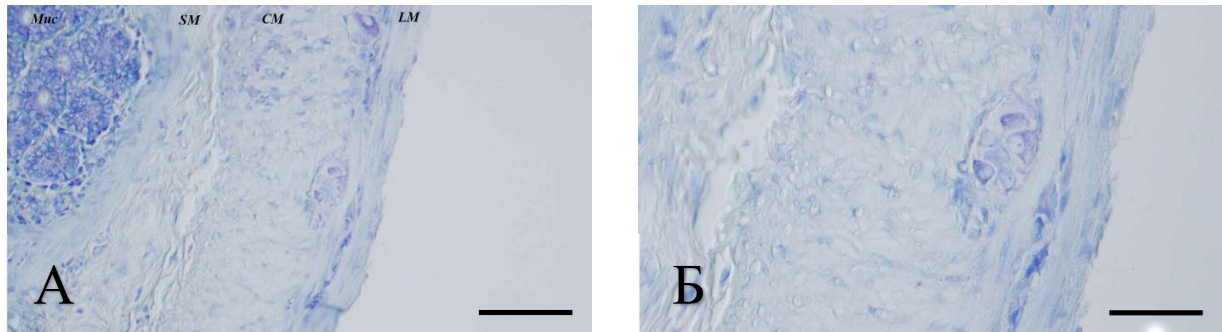


Фигура 59. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Фигура 60. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

Собствени резултати

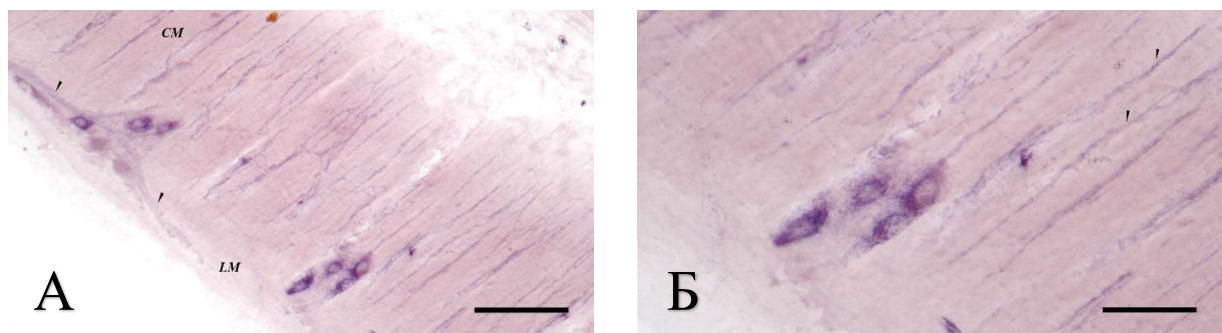


Фигура 61. Оцветяване с толуидиново синьо, демонстриращо миентерални неврони при надлъжен срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение.. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

3. Хистохимична реакция за визуализиране на NADPH-d.

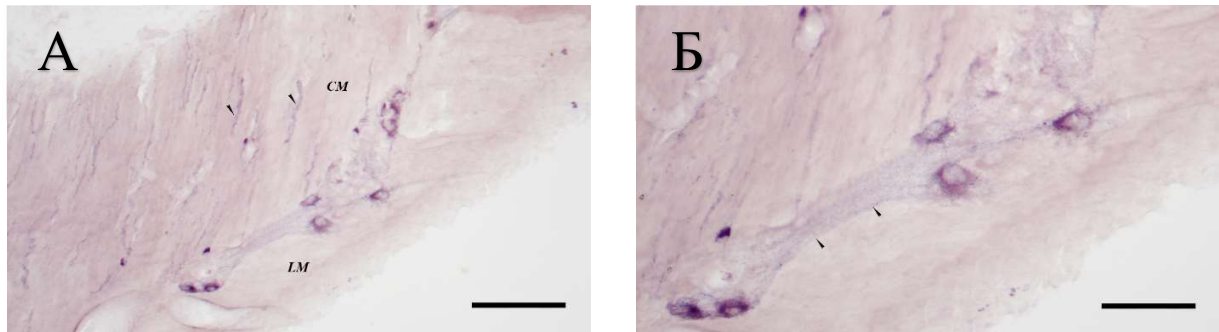
Препаратите при които бе използвана тази техника са предимно на тангенциални срезове и демонстрираха значително присъствие на NADPH-d-позитивни структури. Последните показваха различна степен на интензитет на оцветяването, който ще бъде описан в т. 5 на този раздел. Препаратите бяха изготвени от проксимален колон (фиг. 62-70), дистален колон (фиг. 71-73), ректум (фиг. 74-76) и анален канал (фиг. 77-81).

В ганглиите броят на NADPH-d-позитивните неврони варираше от 3-4 при по-малките ганглии (фиг. 62, 64), до 15-16 при по-големите (фиг. 66, 77). Цитоплазмата изглеждаше гранулирана, като интензитета на оцветяването беше осезаемо по-слаб в колона, в сравнение с аноректалната област.

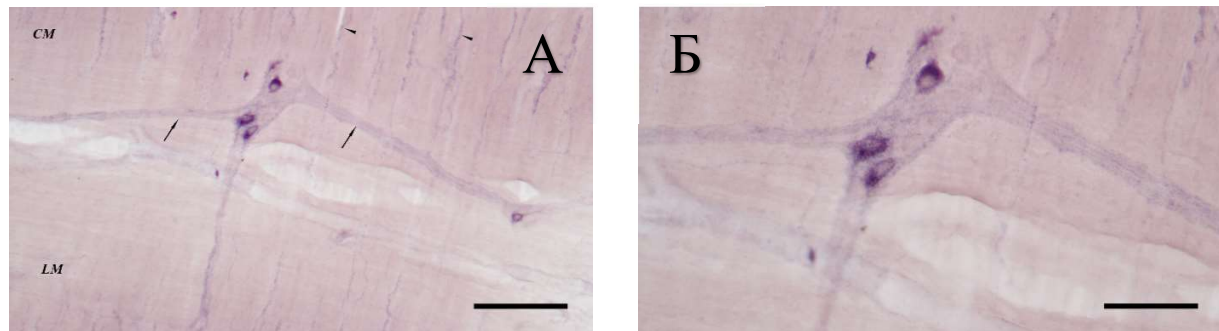


Фигура 62. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се интерганглионерни връзки и варикозно разширени влакна. ЦМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

Собствени резултати



Фигура 63. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна и интерганглионерни връзки (глави на стрелки). СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .



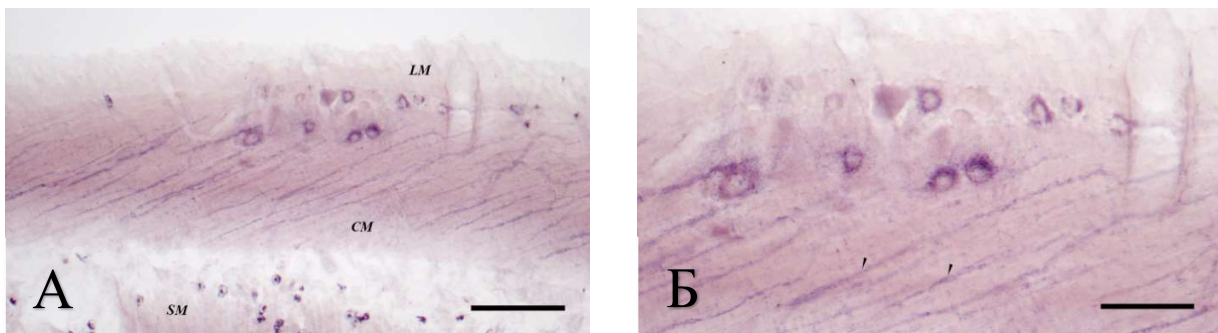
Фигура 64. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се интерганглионерни връзки (стрелки) и варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

В проксималния и дисталния колон интензитетът на оцветяване беше нисък при около половината наблюдавани неврони в ганглия и среден при другата половина (фиг. 62-73). 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 (със среден интензитет на оцветяване), гранулите са в количество, позволяващо грубо контуриране на клетъчната форма, а ядрото остава като ясно обособен окръглен или

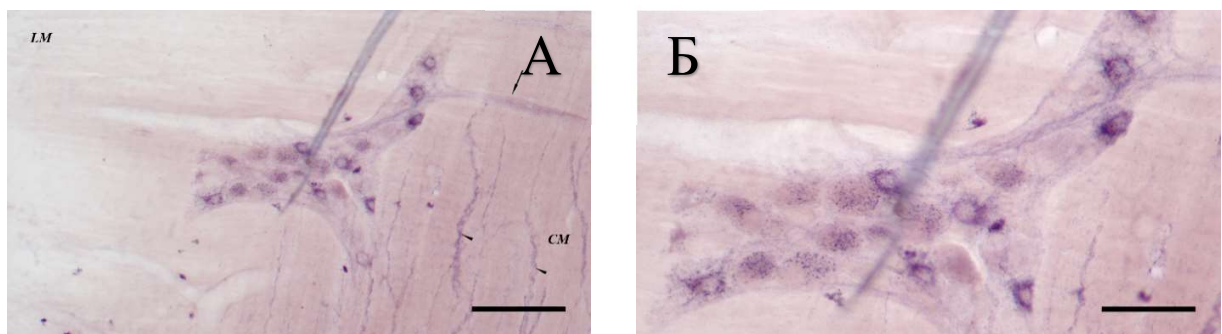
Собствени резултати

овален неочветен участък. Във вътрешността на ганглиите на част от препаратите открихме дифузно разпръснат слабопигментиран материал, които 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 (фиг. 76-78).

При еднакви условия на изработване на препаратите, в аноректалната област наблюдаваното от нас оцветяване на значителна част от невроните може с лекота да се определи като силно (виж по-долу). Невроните със слаба и средна степен на

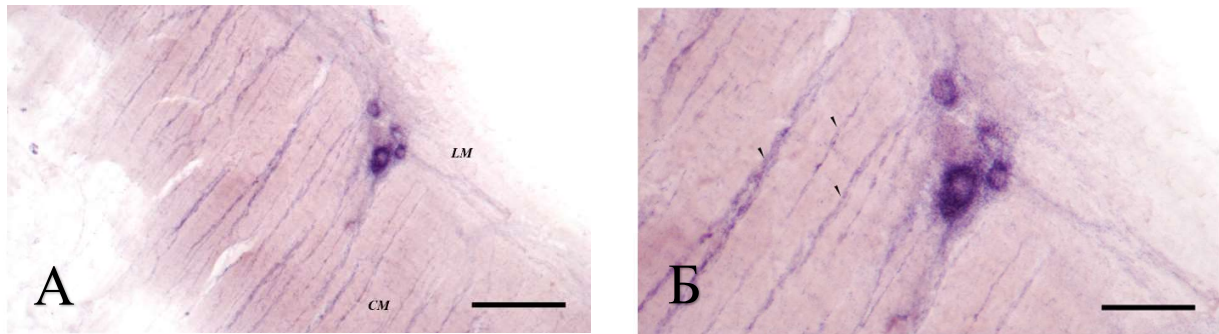


Фигура 65. Хистохимична локализация на *NADPH-d* на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

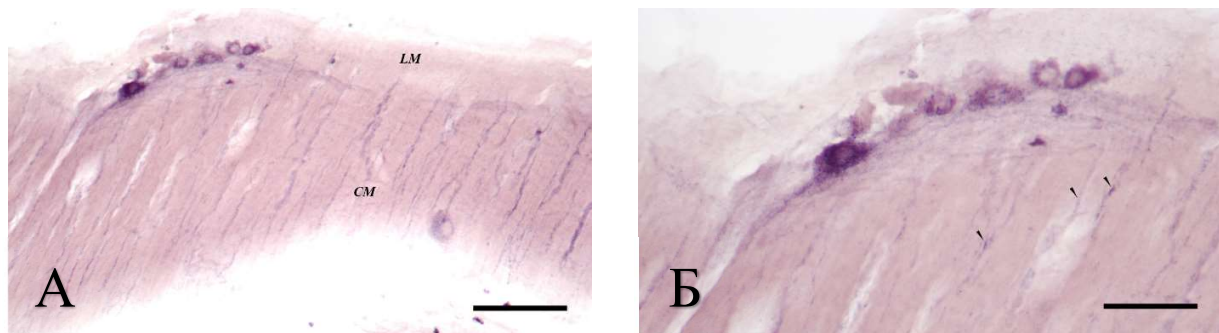


Фигура 66. Хистохимична локализация на *NADPH-d* на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Интерганглионерните връзки са отбелязани със стрелки. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

Собствени резултати



Фигура 67. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



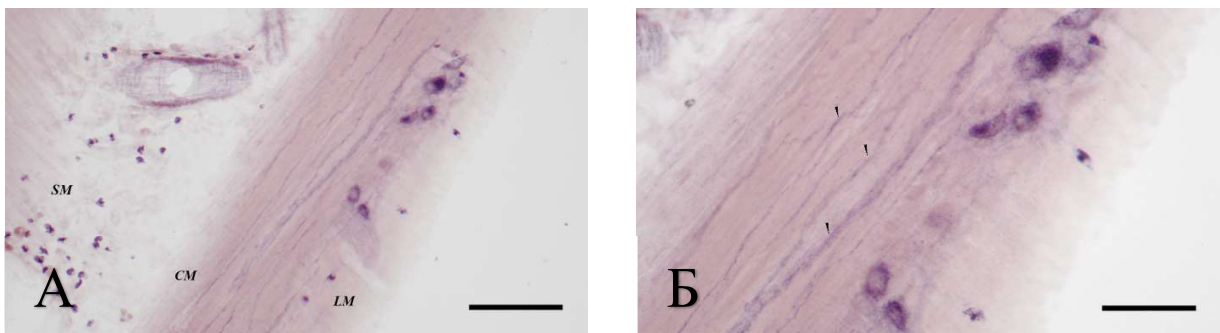
Фигура 68. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

оцветяване, а също и неочетените такива, процентно бяха значително по-малко. При силно оцветените неврони цитоплазмените гранули бяха толкова многобройни и интензивно пигментирани, че цитоплазмата изглеждаше хомогенно оцветена (фиг. 75-81).

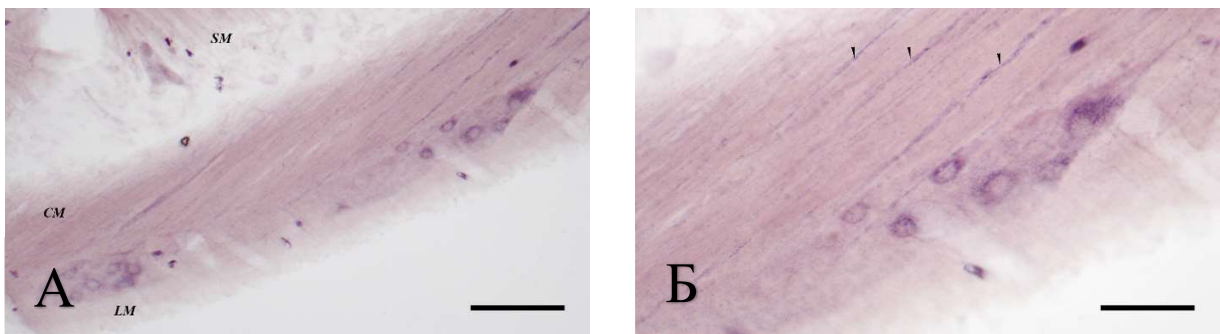
Както изтъкнахме по-горе, препаратите от тази група са изготвени на тангенциални срезове. При тези препарати равнината на среза преминава през невронални тела по оптимален спрямо тяхната триизмерна форма начин. Това, от своя страна, би позволило да се правят изводи за конкретната принадлежност на определени неврони към даден морфологичен тип. Освен NADPH-d-позитивните неврони, на повечето препарати недвусмислено личаха сноповете от миентерални

Собствени резултати

нервни влакна в ЦМП и НМП. Тяхното оцветяване в колона е слабо, но въпреки това те контрастират на фона на изцяло неочетените гладкомускулни влакна. В областта на ганглиите се наблюдават снопове от нервни влакна с различна посока, образуващи ясно отчетлива мрежа, докато в областта на интерганглионерните връзки те имаха подчертано паралелен ход. 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. 75-80).

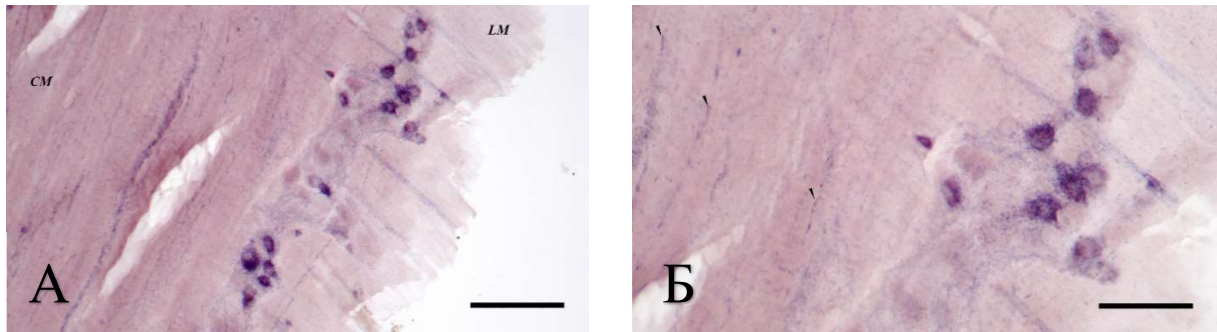


Фигура 69. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

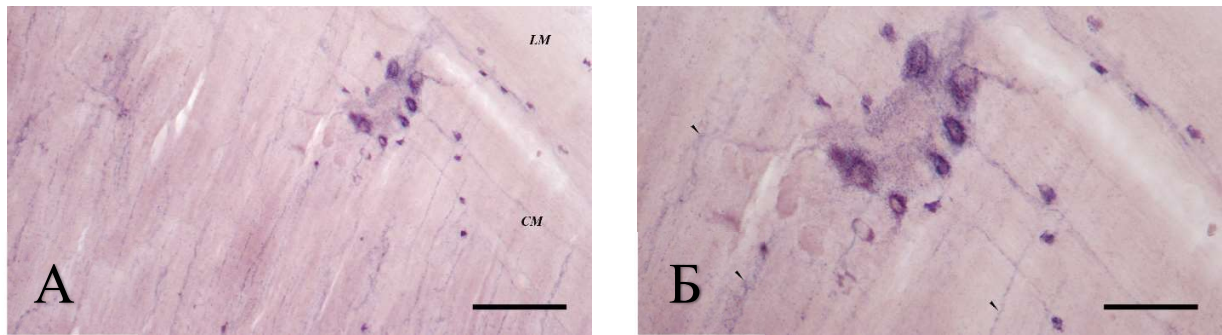


Фигура 70. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

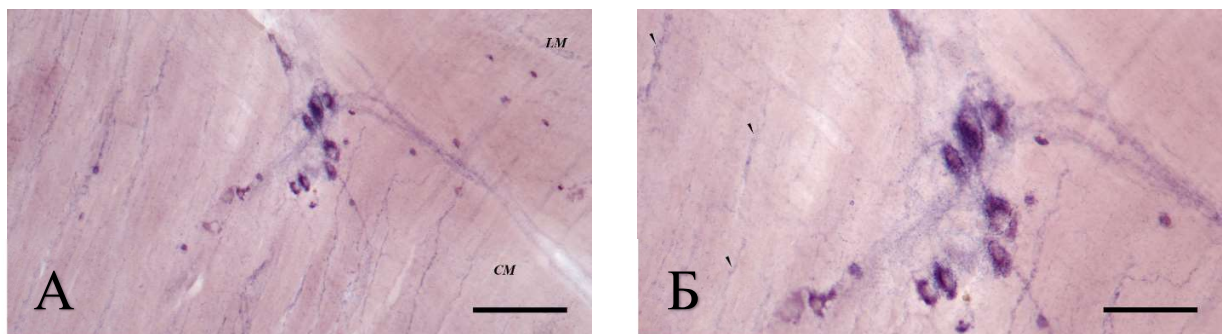
Собствени резултати



Фигура 71. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

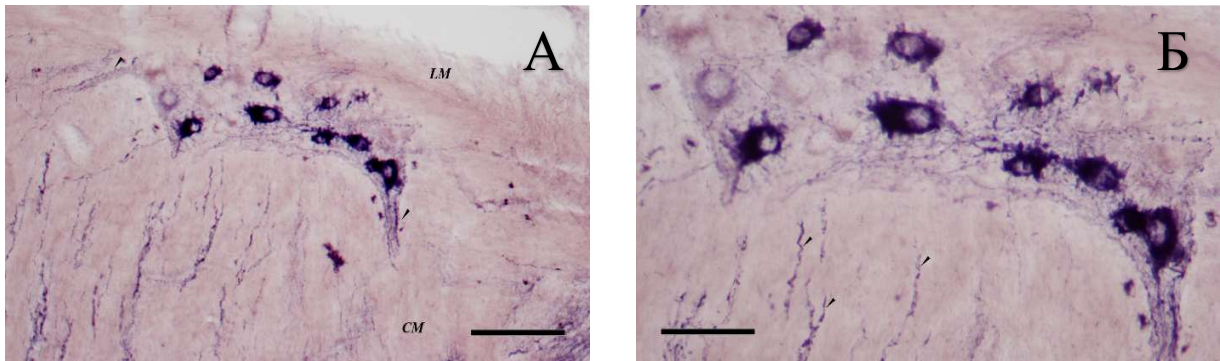


Фигура 72. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

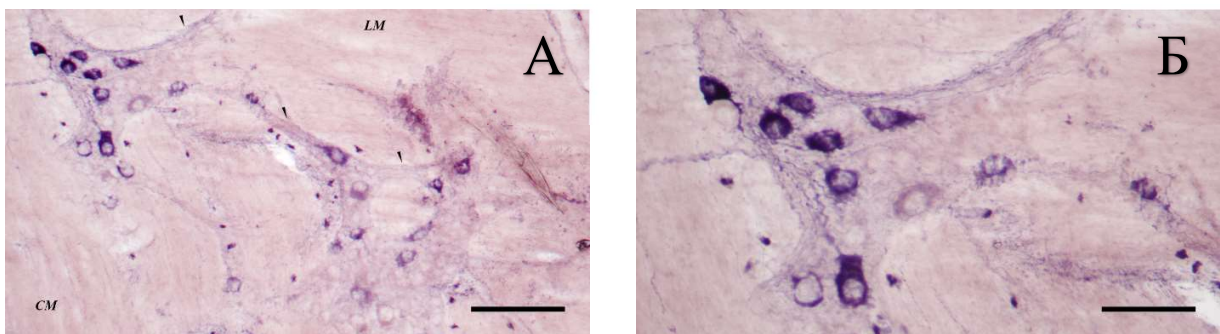


Фигура 73. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). СМ – ЦМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

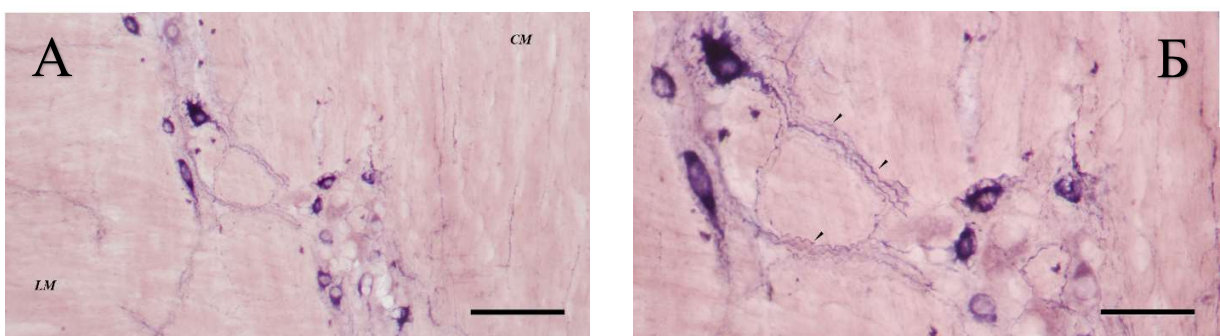
Собствени резултати



Фигура 74. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от ректум на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

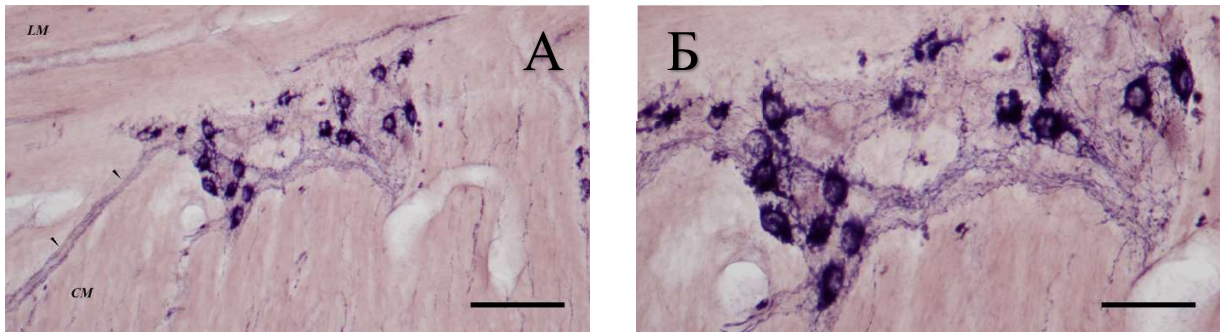


Фигура 75. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от ректум на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. С глави на стрелки са обозначени позитивни интерганглионерни връзки. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

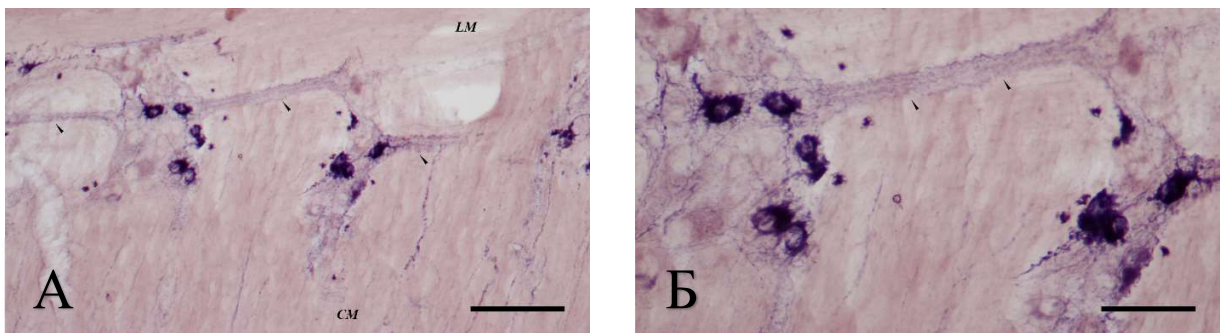


Фигура 76. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от ректум на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. С глави на стрелки са обозначени позитивни интерганглионерни връзки. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

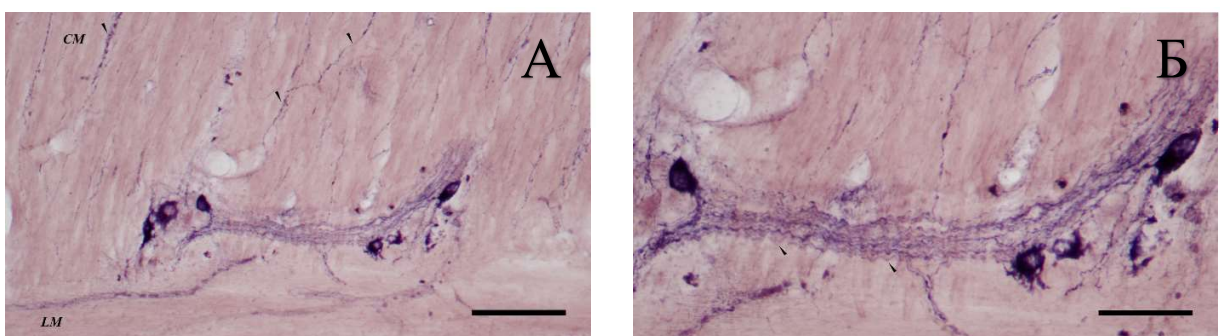
Собствени резултати



Фигура 77. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от анален канал на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. С глави на стрелки е посочена позитивна интерганглионерна връзка. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

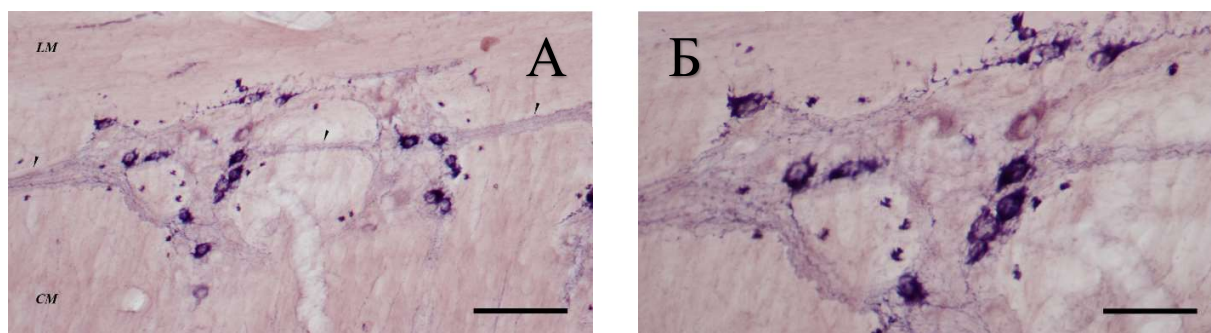


Фигура 78. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от анален канал на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. С глави на стрелки са посочени позитивни интерганглионерни връзки. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

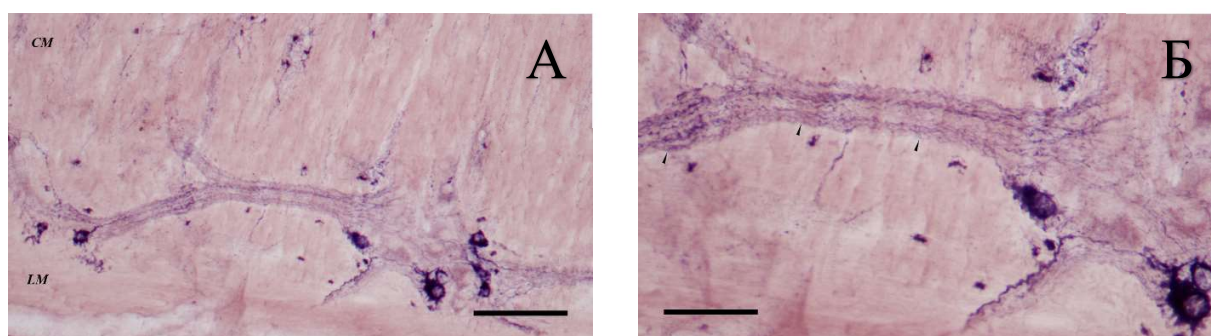


Фигура 79. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от анален канал на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. Наблюдават се варикозно разширени влакна в ЦМП (глави на стрелки). CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

Собствени резултати



Фигура 80. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от анален канал на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. С глави на стрелки са посочени позитивни интерганглионерни връзки. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



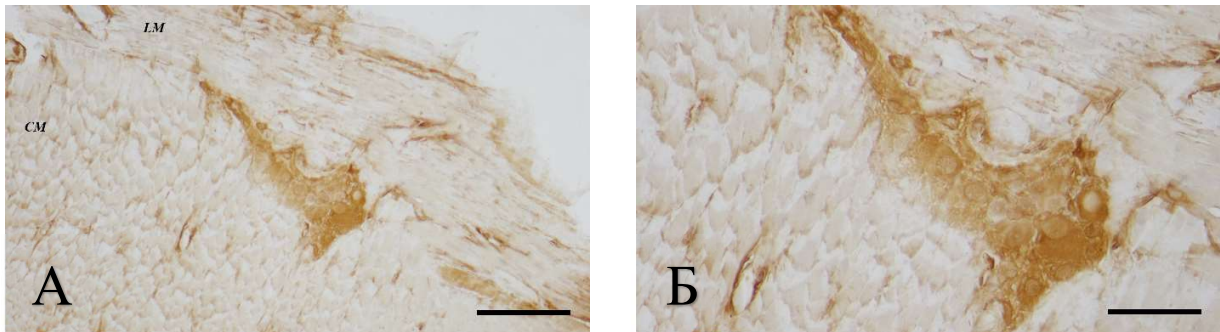
Фигура 81. Хистохимична локализация на NADPH-d на тангенциален срез от анален канал на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносин цвят. С глави на стрелки е посочена позитивна интерганглионерна връзка. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

4. Имунохистохимични реакции

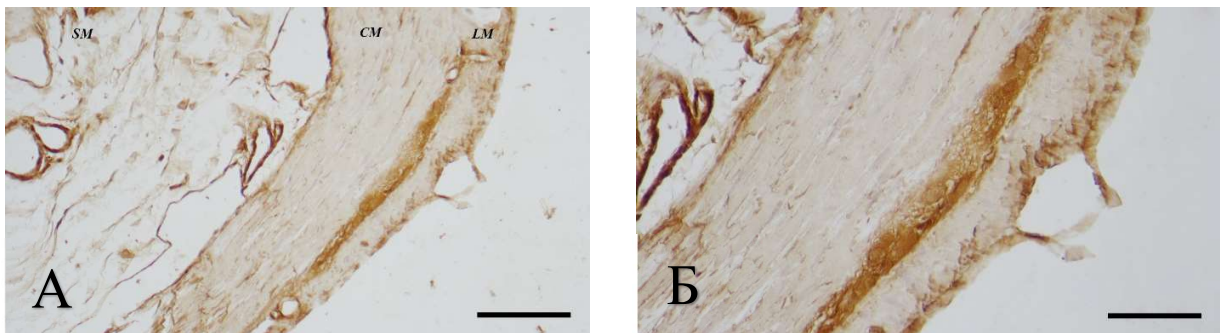
4.1. Имунохистохимия за холин ацетилтрансфераза (ChAT)

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 варираше, но се наблюдаваше подчертана преобладация на неправилната перикарионна форма с множество израстъци (фиг. 82-87).

Собствени резултати



Фигура 82. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури на тангенциален срез през проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

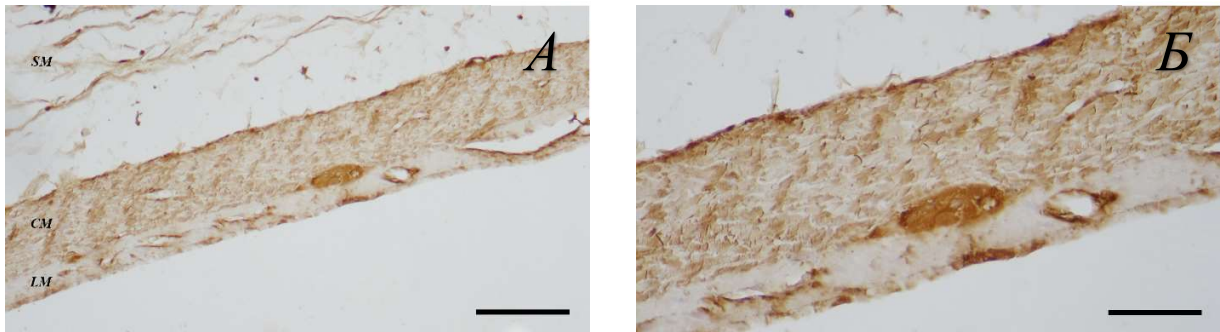


Фигура 83. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури на напречен срез през проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

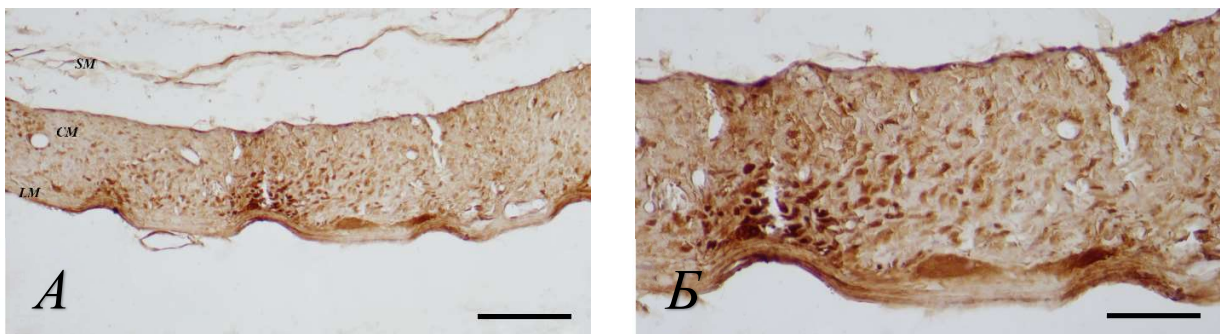
Цитоплазмата на отделните имунопозитивни неврони показваше различия в интензитета на оцветяване. Ядрата на всички неврони бяха с кръгла форма и относително големи размери, слабо оцветени или неочветени. Част от ганглиите съдържаха имунонегативни невронални тела, с ясно обособени контури (фиг. 82). Освен перикарионите на холинергичните неврони, в пределите на ганглиите се откриваха и влакнести находки с променлива посока (фиг. 83). Поради същественото натрупване на оцветител повсеместно в ганглиите, техните контури бяха ясно отграничени на фона на имунонегативните мускулни подслоеове.

ЦМП и НМП притежаваха подчертано стрииран вид поради наличието на множество имунопозитивни влакна, ориентирани успоредно на оста на

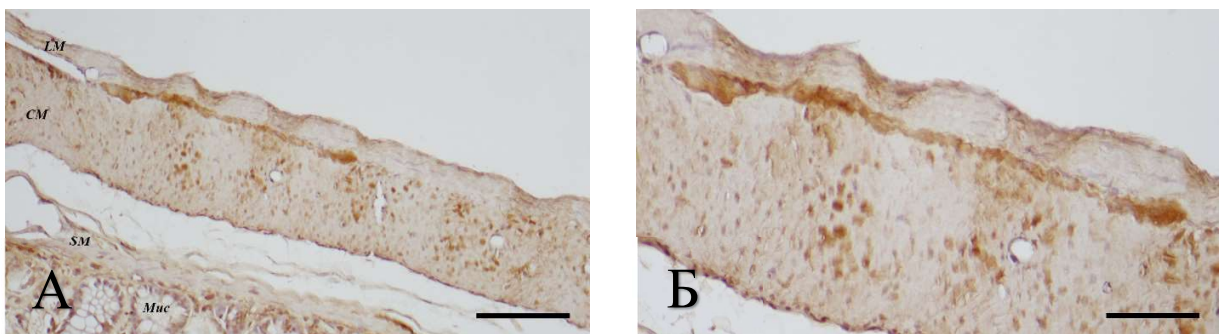
Собствени резултати



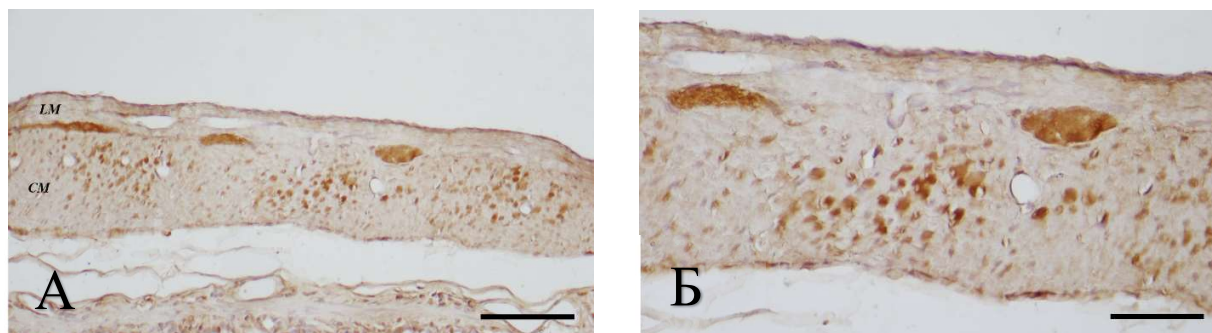
Фигура 84. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури на надлъжен срез през проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Фигура 85. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури на надлъжен срез през дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Фигура 86. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури на надлъжен срез през дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. Мис – лигавица, SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

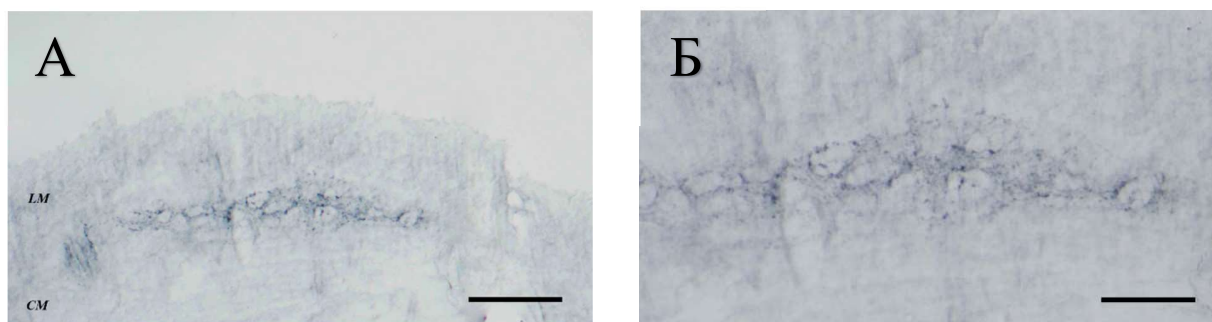


Фигура 87. Имунохистохимично визуализиране на ChAT в нервни структури на надлъжен срез през дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

гладкомускулните клетки (фиг. 82-84). 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. 85-87).

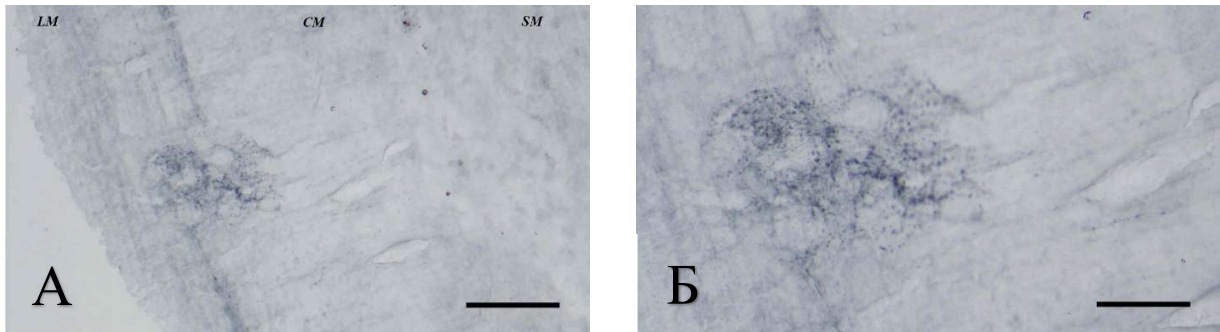
4.2. Имунохистохимично доказване на субстанция Р (SP)

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. 88-93)

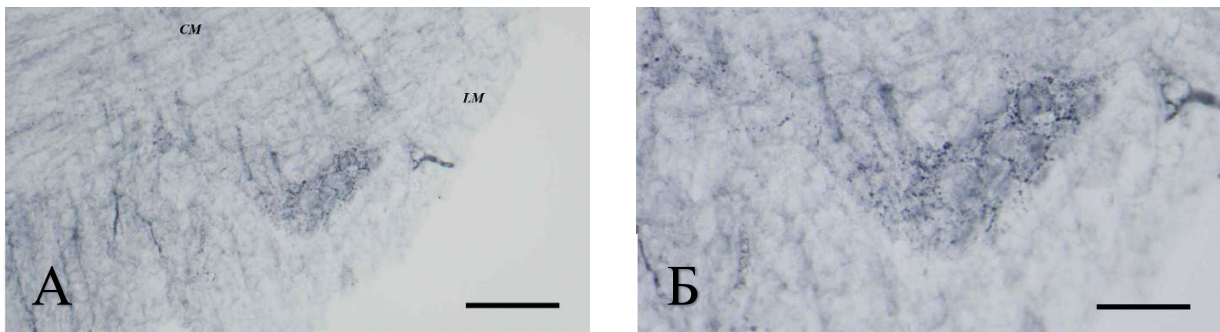


Фигура 88. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. След никелова интензификация, имунопозитивната реакция се маркира в тъмносиньо. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

Собствени резултати



Фигура 89. Експресия на SP в MS на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмносиньо. SM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



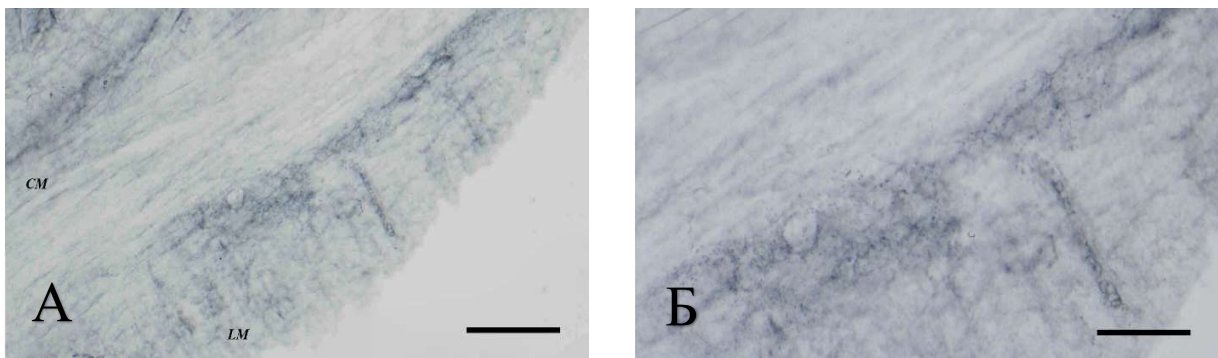
Фигура 90. Експресия на SP в MS на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмносиньо. SM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

и дисталния колон (фиг. 94-96) не установихме наличие на никакви имунопозитивни невронални тела. Въпреки това, имунооцветените 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 клетъчните контури. Въпреки че такива се откриваха в целите ганглии, най-отчетливите аксонални варикозитети бяха именно тези, видяни в непосредствен контакт с имунонегативните тела. Лесно забележими бяха и интерганглионерните връзки, разположени между двата мускулни слоя, поради тяхната силно изразена имунореактивност и наличие на варикозитети. В ЦМП и НМП регистрирахме трудно отграничими имунореактивни влакна, ориентирани успоредно на гладкомускулните влакна. Интензитетът на

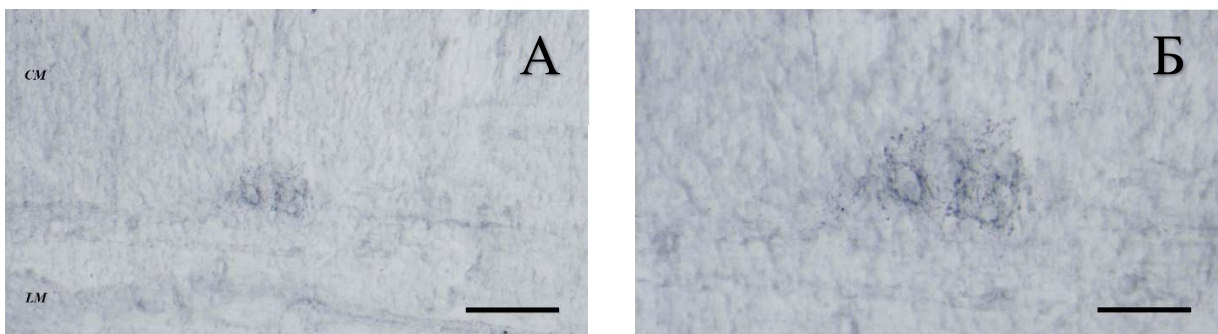
Собствени резултати

оцветяването беше значително по-слаб от този в интерганглионерните връзки, а имунореактивните варикозитети бяха по-малобройни.

Находките описани при колона са напълно аналогични на тези, открити в ректума (фиг. 97-102) и аналния канал (фиг. 103-106), въпреки прилагането на различен хромоген за визуализация на имунореакцията (съответно SG и DAB). Новост в находките в тези две области е установеното наличие на единични имунореактивни невронални тела в част от ганглиите (фиг. 97, 103-106). Те се характеризираха с натрупване на интензивно оцветени цитоплазмени гранули. В

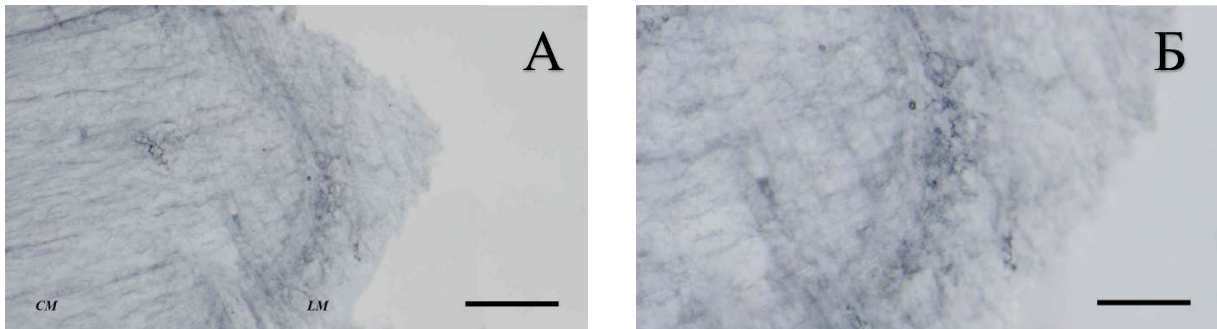


Фигура 91. Експресия на SP в MC, представена на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносиньо. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

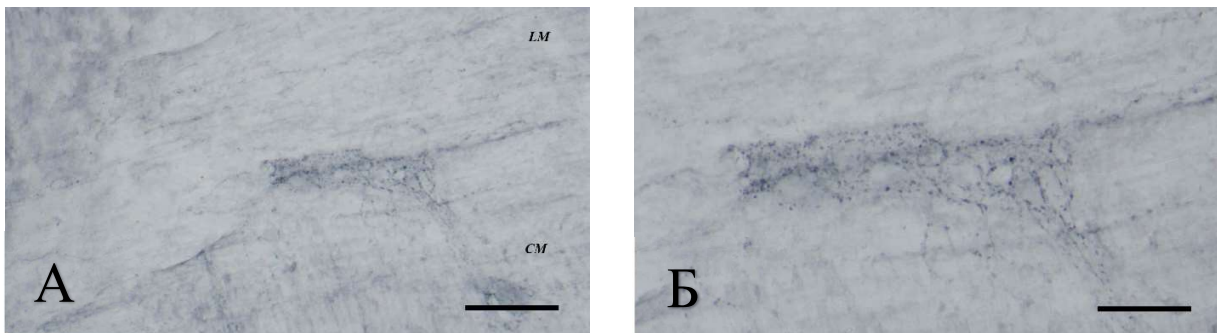


Фигура 92. Експресия на SP в MC, представена на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносиньо. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

Собствени резултати



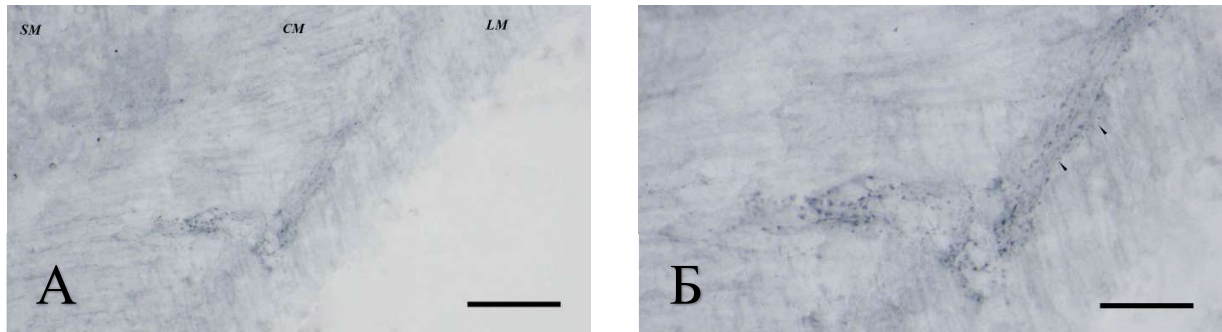
Фигура 93. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от проксимален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносиньо. СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.



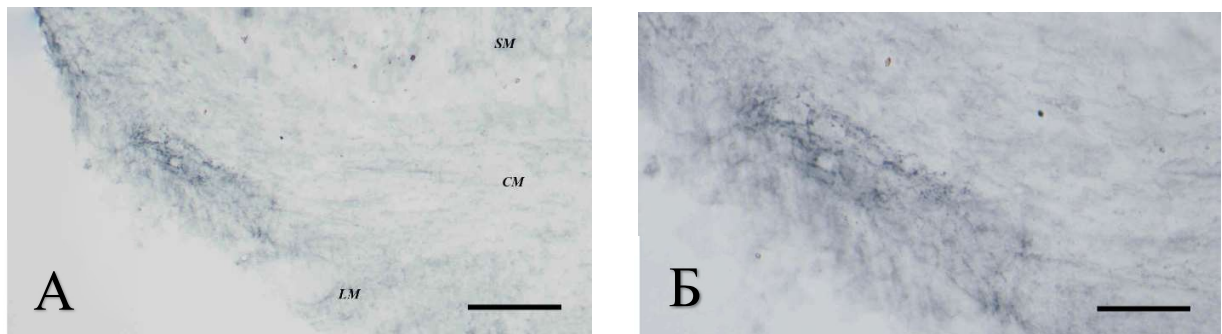
Фигура 94. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмносиньо. СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

единични неврони последните бяха толкова многобройни, че придаваха на цитоплазмата хомогенен характер (фиг. 105, 106). Перикарионите на тези неврони бяха с неправилна форма, поради наличието на цитоплазмени израстъци. Поради тангенциалния характер на използваните срезове, интерганглионерните връзки бяха честа находка. Също както в ганглиите, и те показваха варикозни разширения (фиг. 97-101). В двата мускулни подслоя сноповете от имунореактивни влакна бяха лесно забележими поради интензивното им имунооцветяване, често визуализирани с вълнообразен характер и с изразени варикозни разширения.

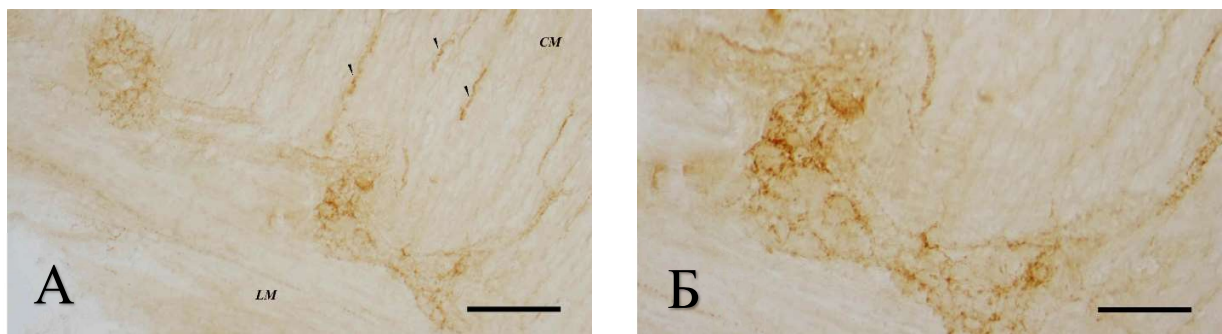
Собствени резултати



Фигура 95. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмносиньо, визуализирана с DAB с последваща никелова интензификация. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

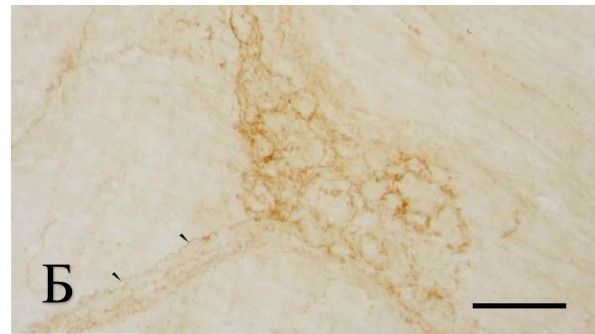
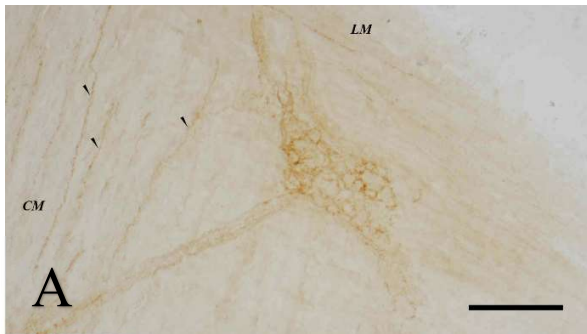


Фигура 96. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от дистален колон на малко (А) и голямо (Б) увеличение. След никелова интензификация, имунопозитивната реакция се маркира в тъмносиньо. SM – подлигавичен слой, CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

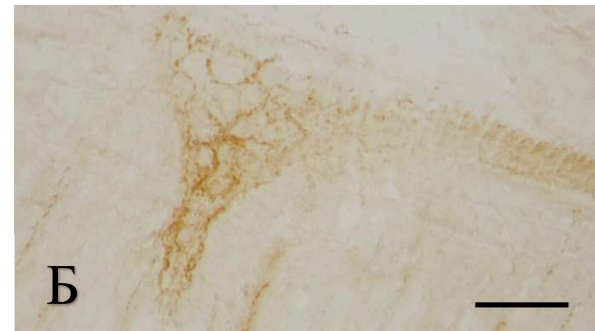
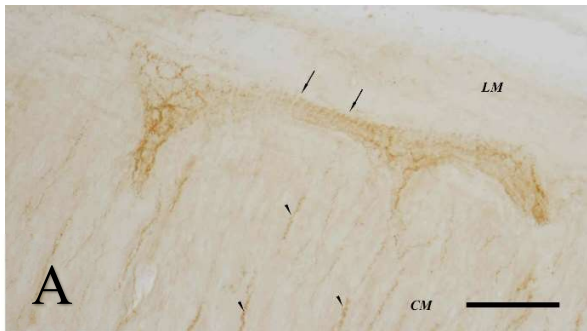


Фигура 97. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се снопове имунореактивни влакна в ЦМП (глави на стрелки). Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво, визуализирана с хромогена DAB. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

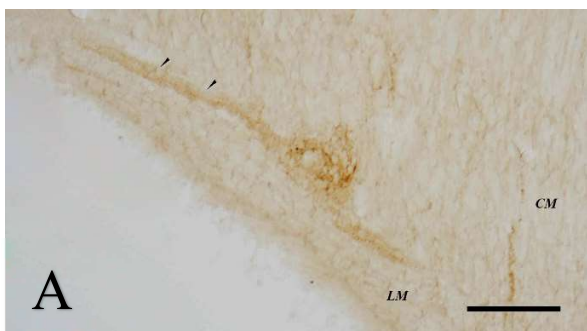
Собствени резултати



Фигура 98. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се снопове имунореактивни влакна в ЦМП и интерганглионерна връзка (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

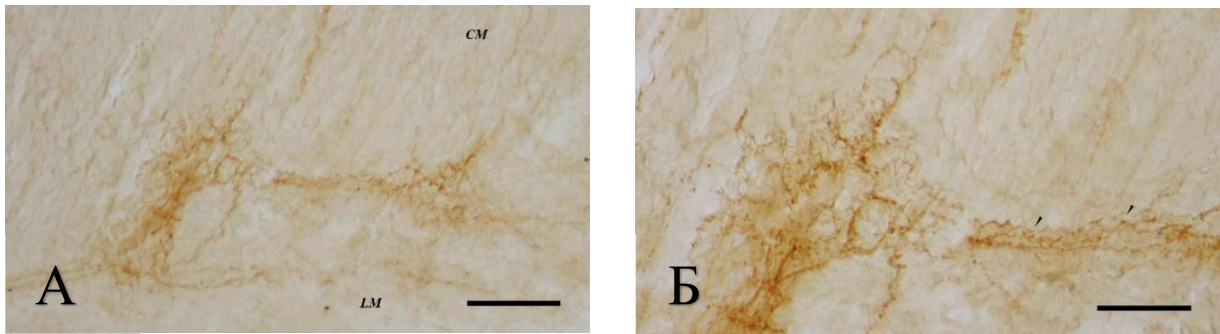


Фигура 99. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се интерганглионерна връзка (стрелки) и снопове имунореактивни влакна в ЦМП (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

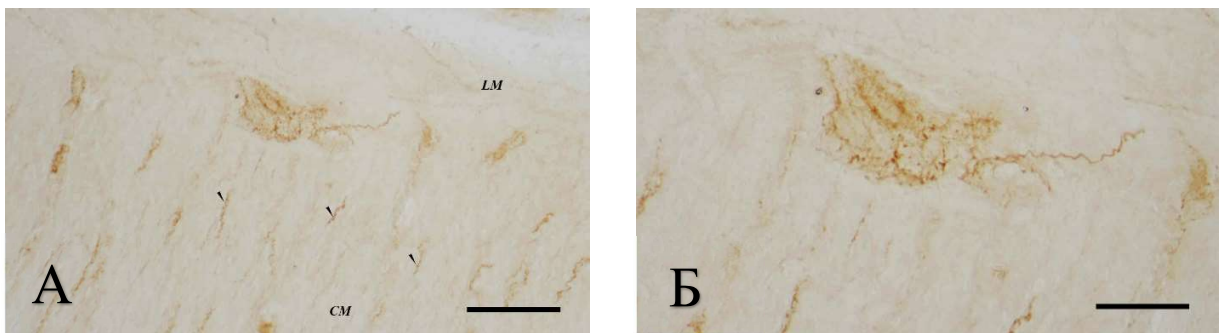


Фигура 100. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се интерганглионерна връзка (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

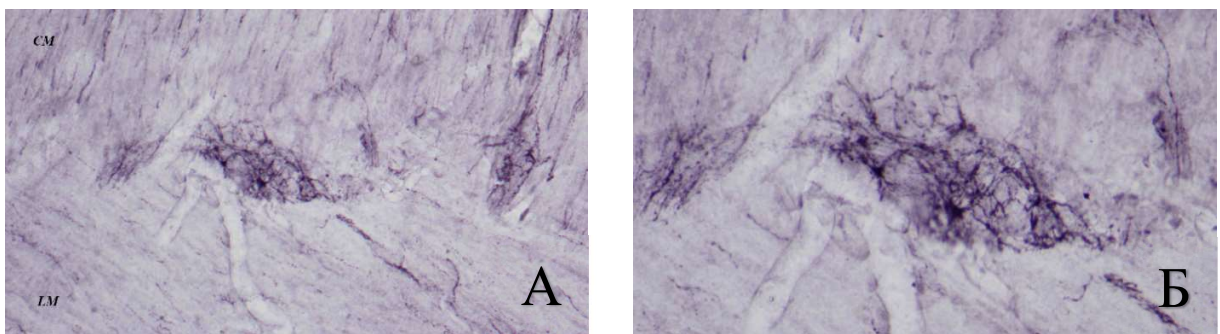
Собствени резултати



Фигура 101. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдава се имунореактивна интерганглионерна връзка (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

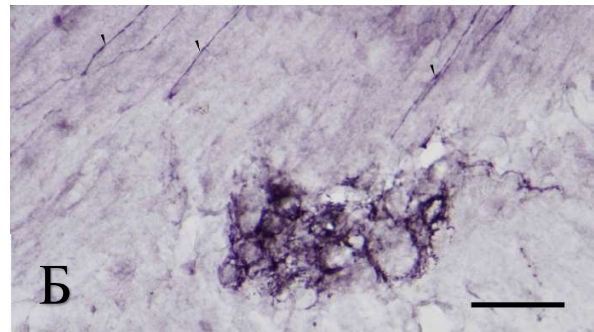
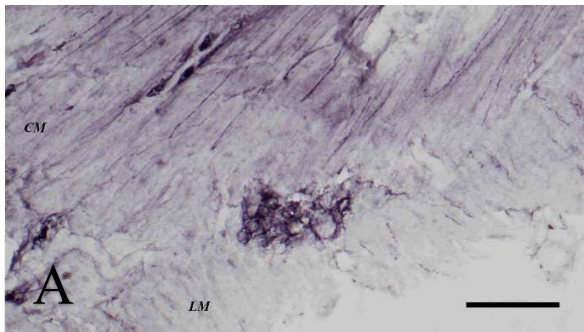


Фигура 102. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се снопове имунооцветени влакна в ЦМП (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

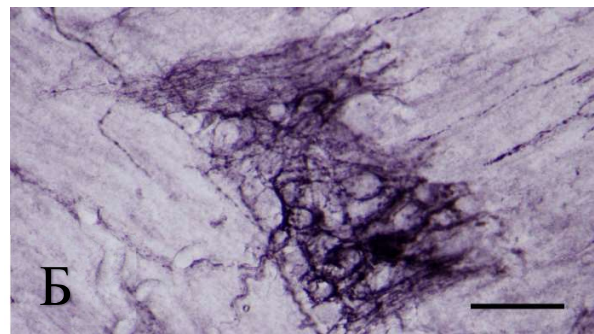
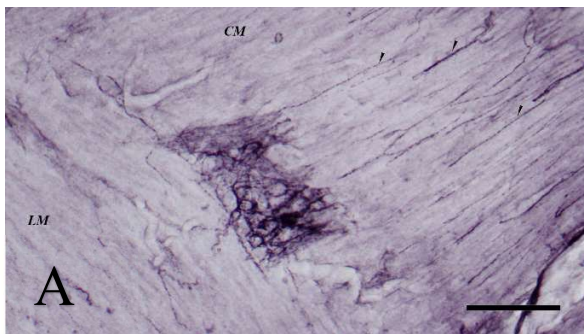


Фигура 103. Експресия на SP в МС, представена на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнолилаво, визуализирана с SG. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

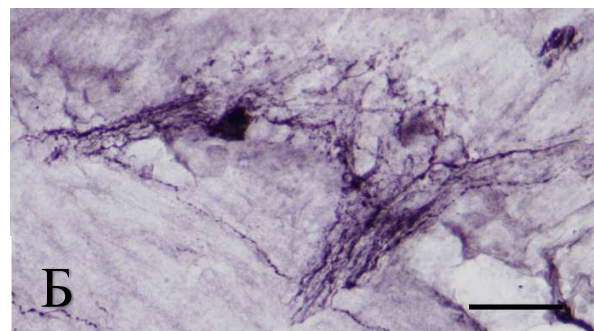
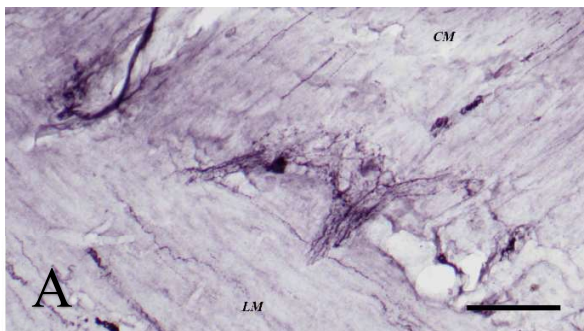
Собствени резултати



Фигура 104. Експресия на SP в MC, представена на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се снопове имунооцветени влакна в ЦМП (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнолилаво. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



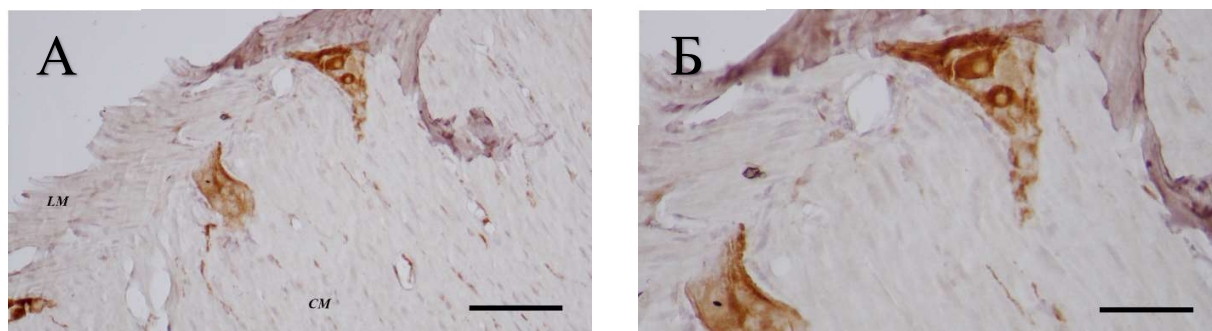
Фигура 105. Експресия на SP в MC, представена на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Наблюдават се снопове реактивни влакна в ЦМП (глави на стрелки). Позитивната реакция се маркира в тъмнолилаво. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



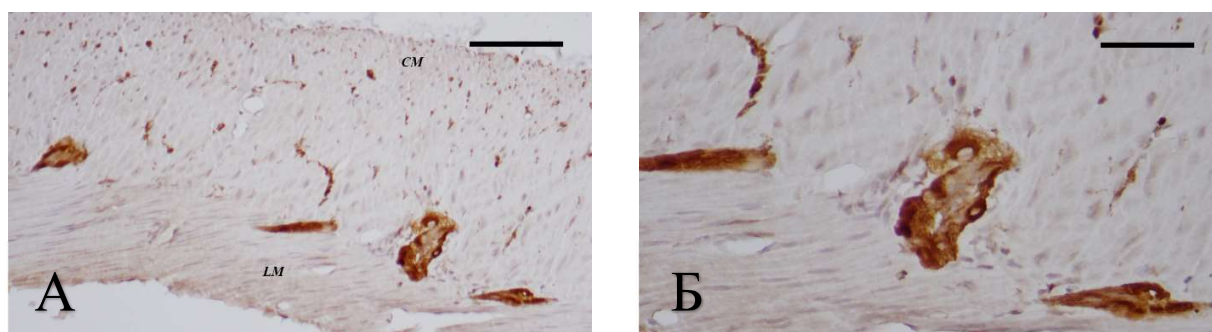
Фигура 106. Експресия на SP в MC, представена на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнолилаво от хромогена. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

4.3. Имунохистохимия за pNOS:

Изготвените за целите на имунохистохимичното доказване на невроналната изоформа на азотен оксид синтазата препарати обхващаха цялата КРО: проксимален колон (фиг. 107-109), дистален колон (фиг. 110-112), ректум (фиг. 113-116) и анален канал (фиг. 117, 118). 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. Самите ганглии притежаваха съвсем отчетливи контури, поради цялостното им, макар и с променлив интензитет, оцветяване. Формата им беше разнообразна: издължена и със заострени краища (фиг. 109, 111-113), окръглена

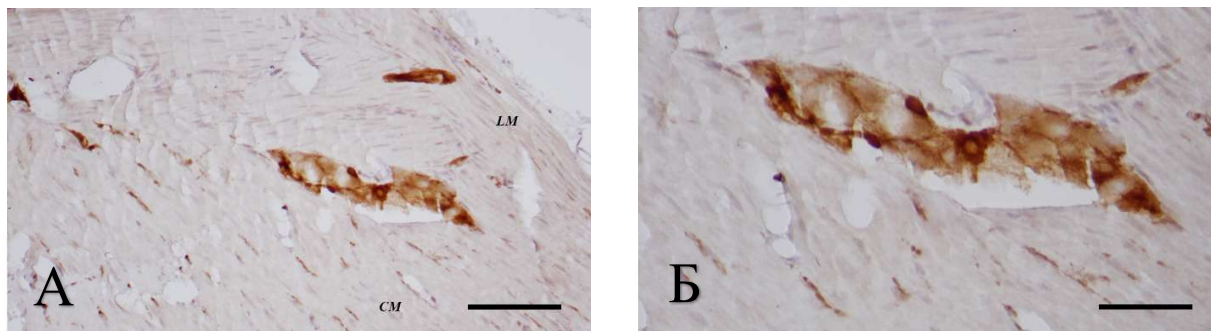


Фигура 107. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

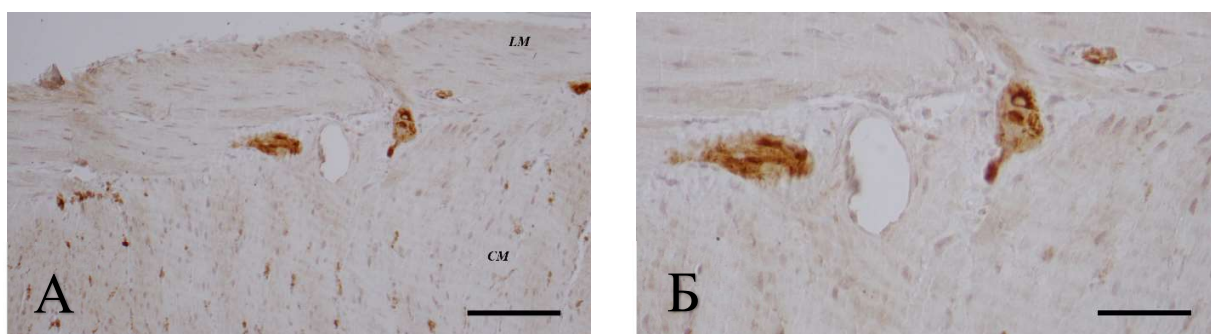


Фигура 108. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

Собствени резултати



Фигура 109. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.



Фигура 110. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

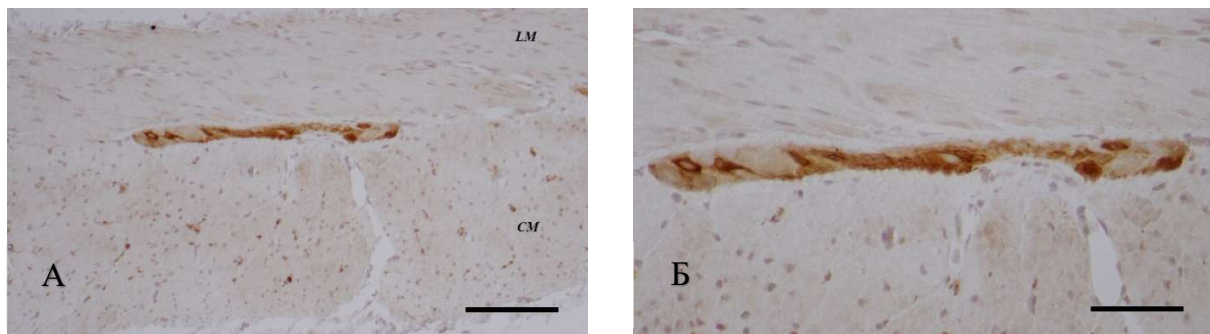
(фиг. 108, 116, 118) или неправилна (фиг. 107, 114, 115). На определени места в тях се открояваха силно имунореактивни невронални тела. Формата им варираше, но най-широко бяха застъпени полигоналните перикариони, с няколко изразени израстъка (фиг. 107, 109, 113). В голяма част от тях се откриваше голямо, имунонегативно и често леко издължено ядро.

Освен описаните силно контрастиращи клетъчни тела, в по-голямо количество се визуализираха и такива със значително по-слаб интензитет на оцветяване (фиг. 109, 114). 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 фибрилерен вид. Това оцветяване беше със среден по сила

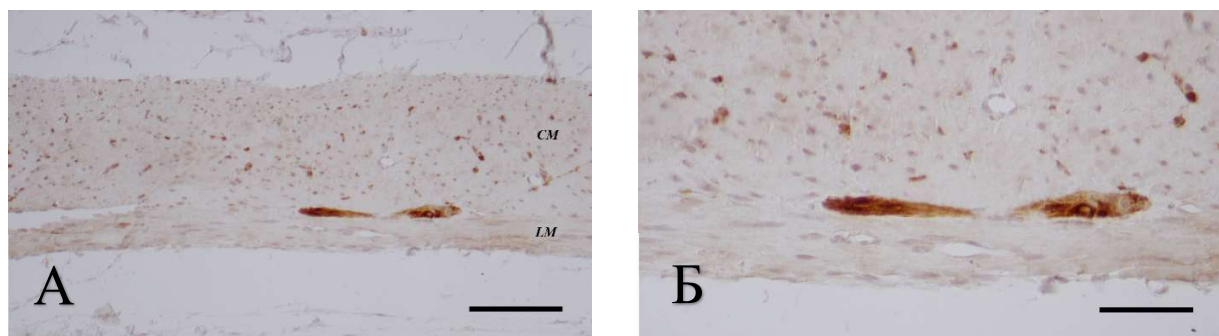
Собствени резултати

интензитет и най-вероятно дължащо се на белязани снопове от интраганглионерни нервни влакна.

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

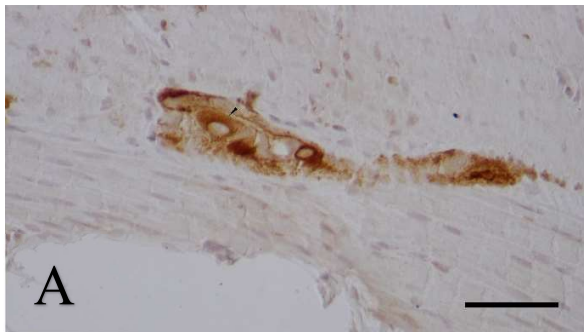


Фигура 111. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

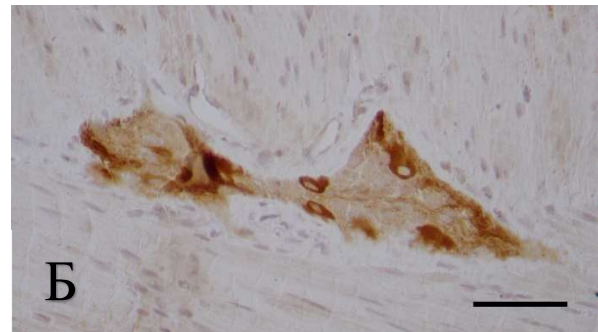


Фигура 112. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, ЛМ – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

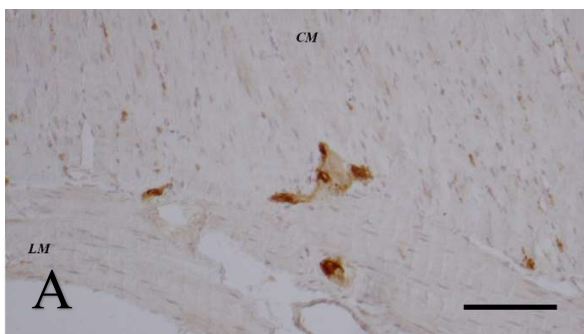
Собствени резултати



Фигура 113. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на голямо увеличение. Имунопозитивната реакция е маркирана в тъмнокафяво. Размерна линия: 50 μ m.



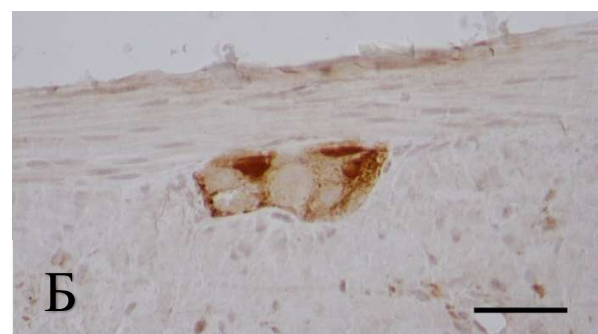
Фигура 114. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на голямо увеличение. Имунопозитивната реакция е маркирана в тъмнокафяво. Размерна линия: 50 μ m.



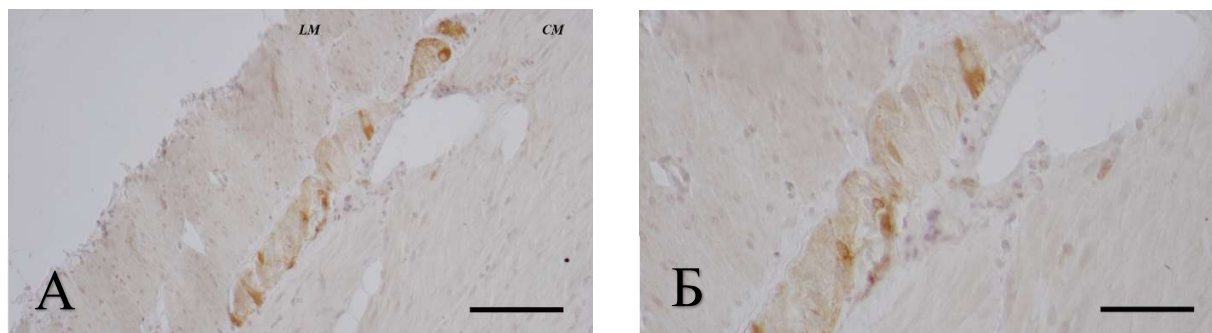
Фигура 115. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



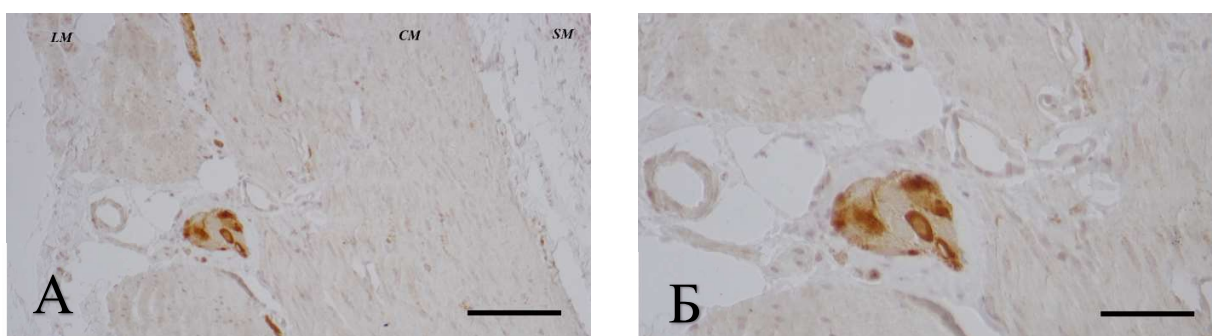
Фигура 116. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. CM – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Собствени резултати



Фигура 117. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивното оцветяване на белязаните структури се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.



Фигура 118. Визуализация на имунореактивни за pNOS миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Имунопозитивното оцветяване на белязаните структури се маркира в тъмнокафяво. SM – подлигавичен слой, СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

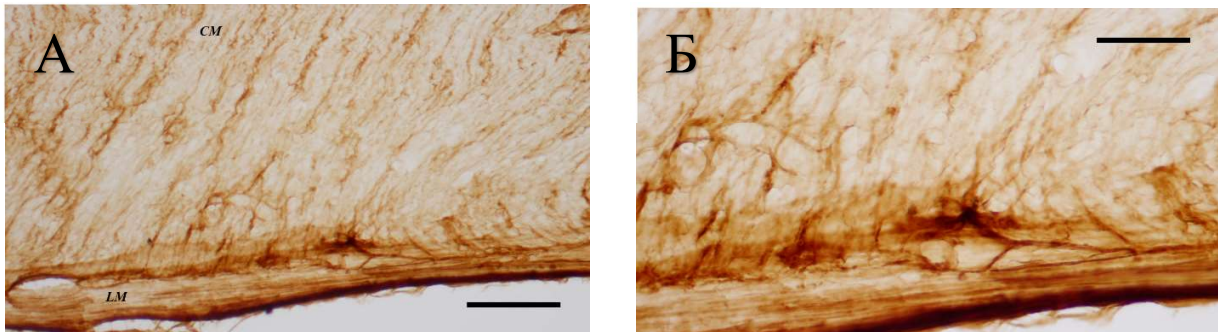
4.4. Имунохистохимия за АТФ

Изготвените препарати за демонстриране на АТФ имунореактивност в МС са от цялото протежение на КРО: проксимален колон (фиг. 119-121), дистален колон (фиг. 122-124), ректум (фиг. 125-127) и анален канал (фиг. 128-134). Локализирането на МС при имунохистомичната реакция за АТФ не беше трудно поради силното натрупване на пигмент в нервните структури. Въпреки това, наблюдаването на имунопозитивни неврони беше изключителна рядкост (фиг. 134).

Поради наличието на имунореактивни нервни влакна, преминаващи в периферията на МГ, последните бяха отчетливо контурирани и отделени от околните

Собствени резултати

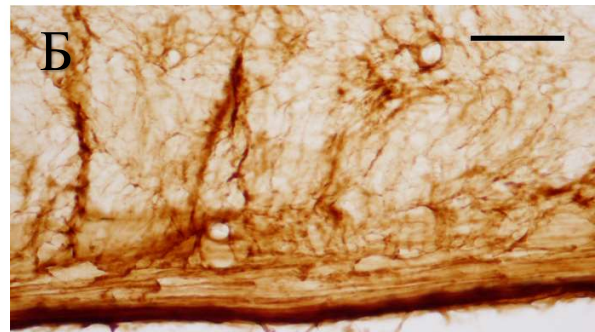
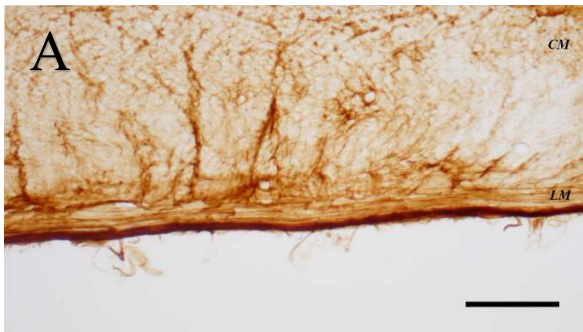
тъкани, но за сметка на това най-често изглеждаха оптически празни (фиг. 121, 128, 129, 131). На определени места, в самите ганглии влакната образуваха точковидни структури с изглед на варикозитети, които ограждаха оптически празни полета, отговарящи по форма и големина на имунонегативни невронални тела (фиг. 125, 132, 134). Имунопозитивни перикариони открихме само в единични ганглии.



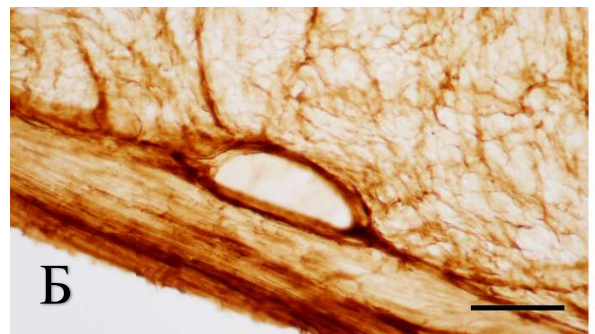
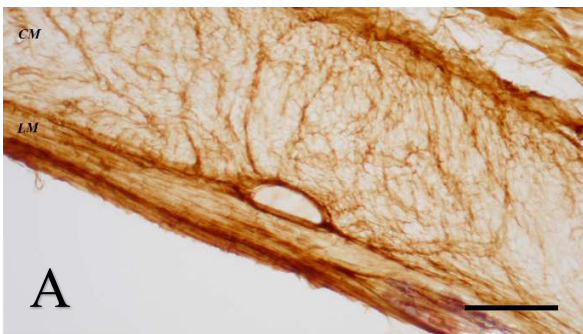
Фигура 119. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миеотерични нервни структури на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ m, Б – 50 μ m.

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 тази имунохистохимична реакции бе установеното видимо наличие на снопове влакна в НМП, което не се наблюдаваше в останалите имунохистохимични реакции които проведохме в нашето проучване (фиг. 119-129).

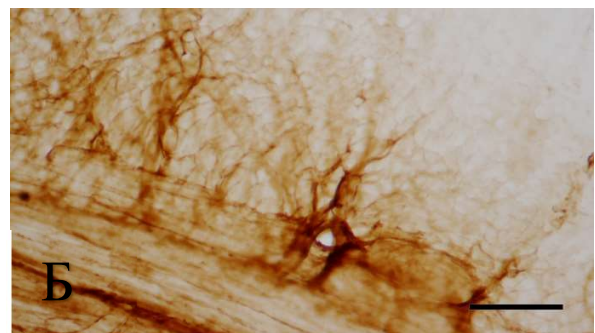
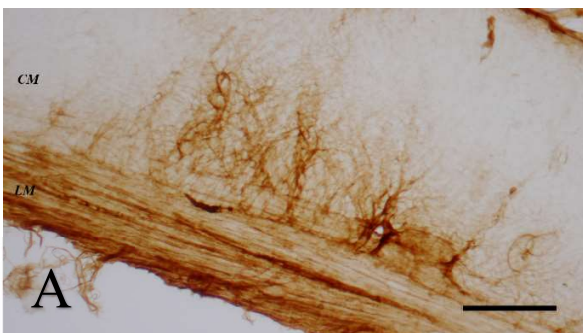
Собствени резултати



Фигура 120. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

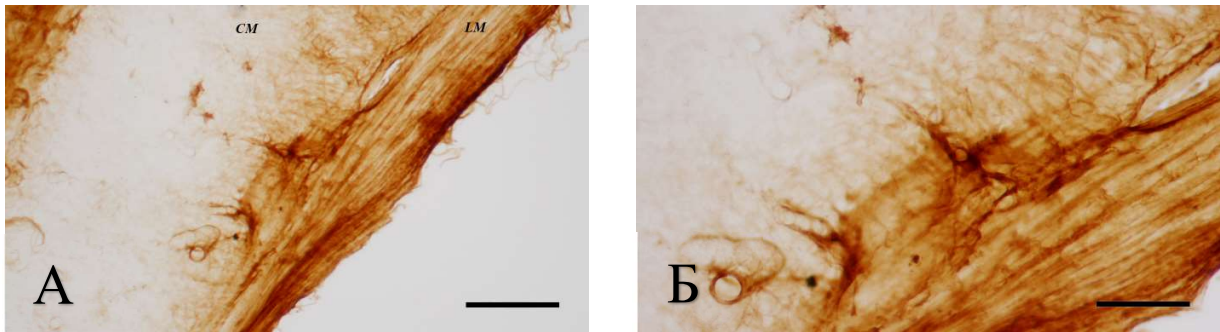


Фигура 121. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от проксимален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

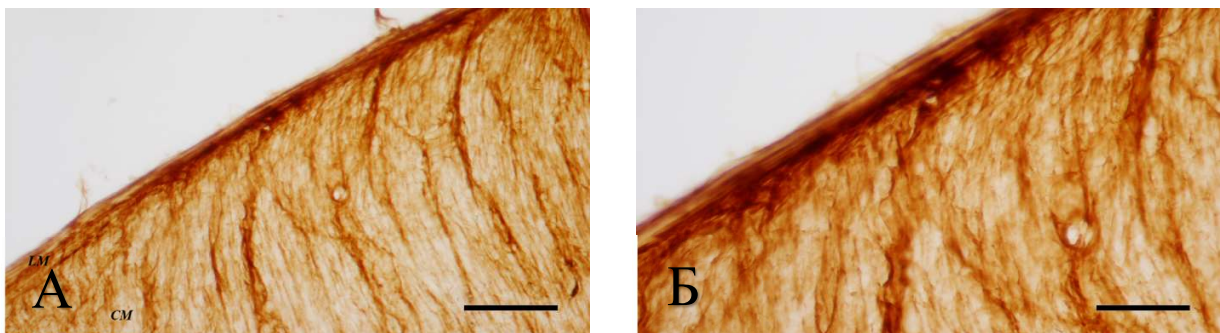


Фигура 122. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

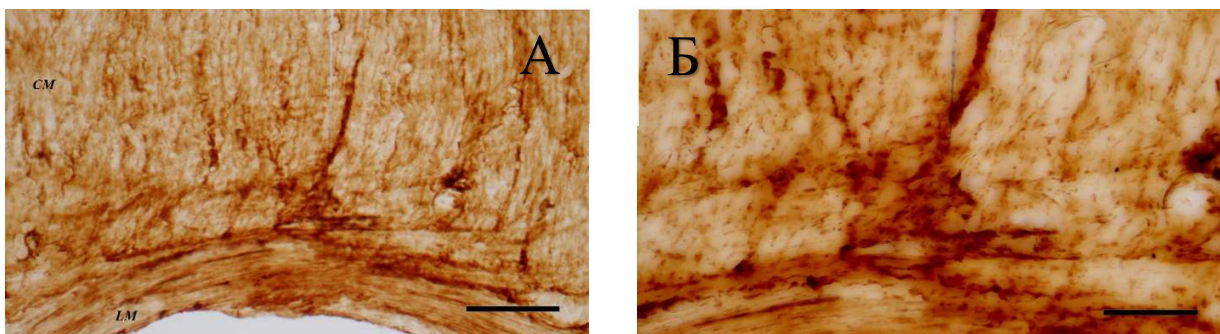
Собствени резултати



Фигура 123. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

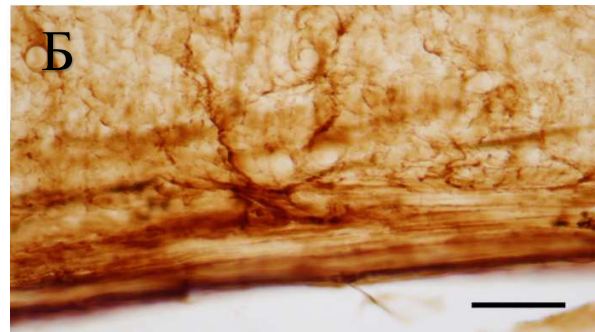
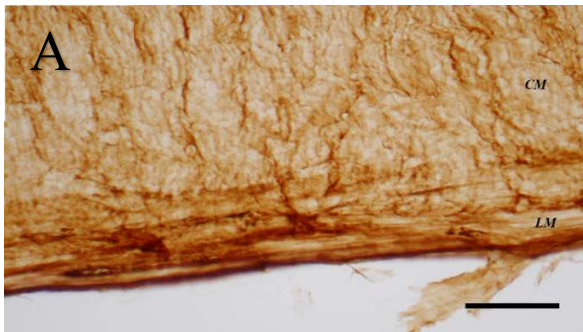


Фигура 124. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от дистален колон на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

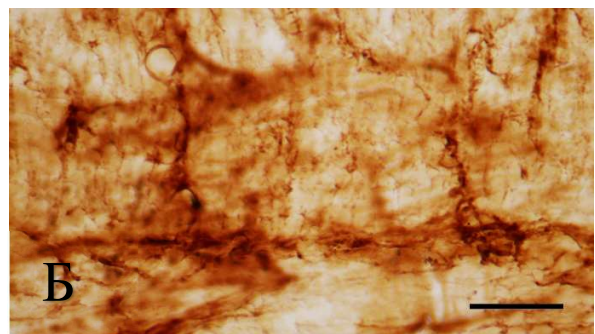
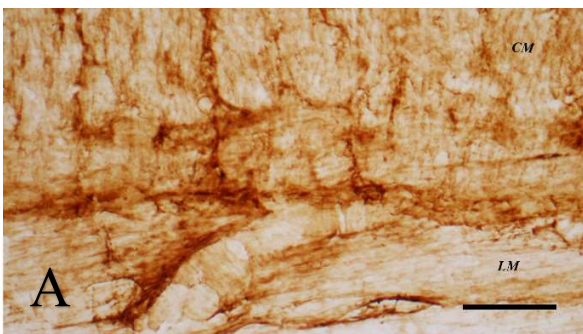


Фигура 125. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 µm, Б – 50 µm.

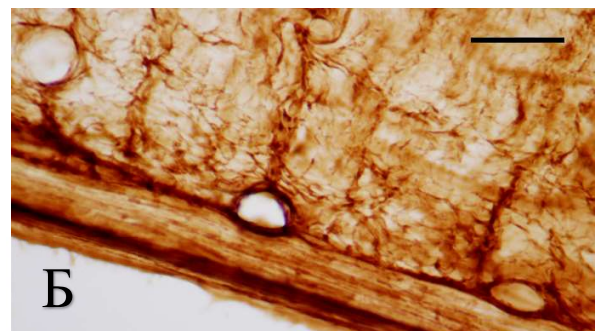
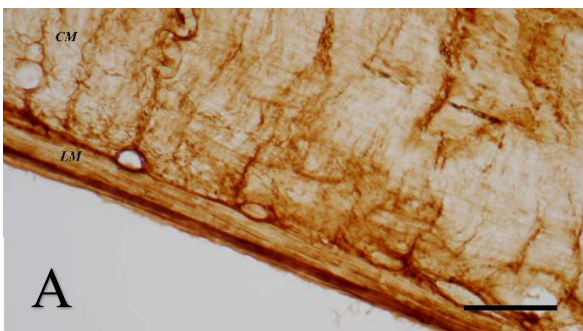
Собствени резултати



Фигура 126. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

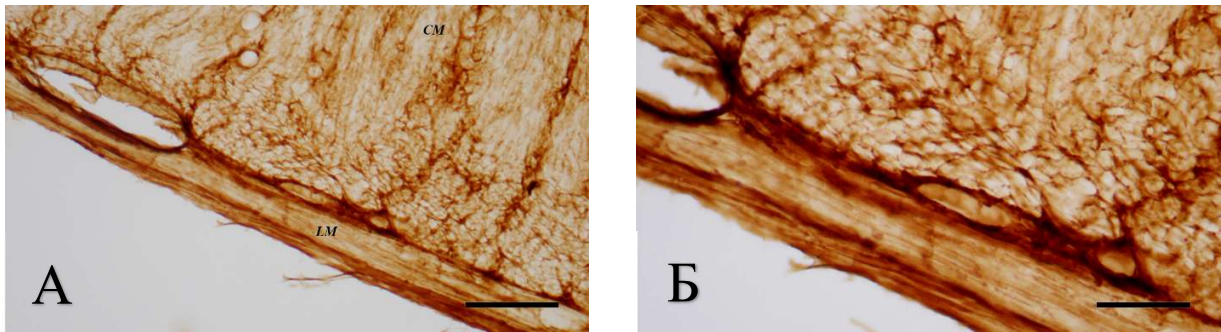


Фигура 127. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от ректум на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

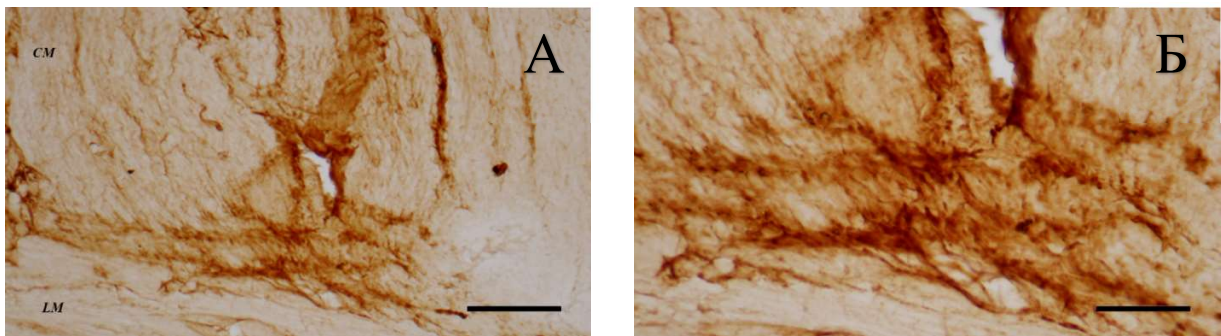


Фигура 128. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .

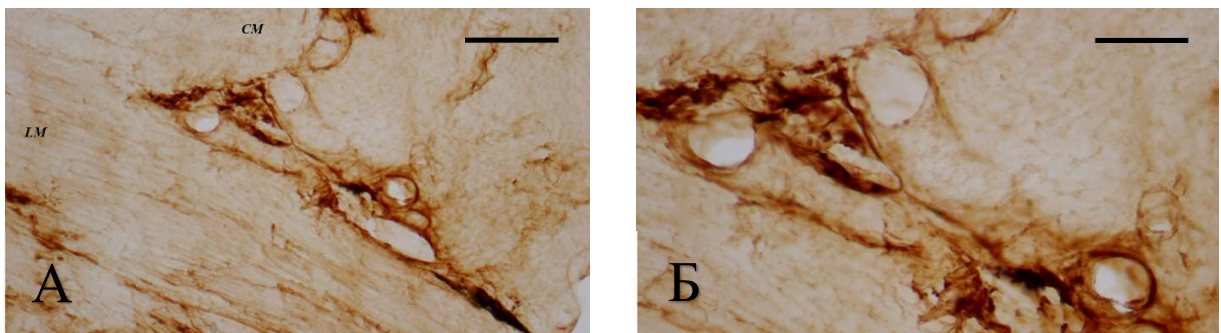
Собствени резултати



Фигура 129. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

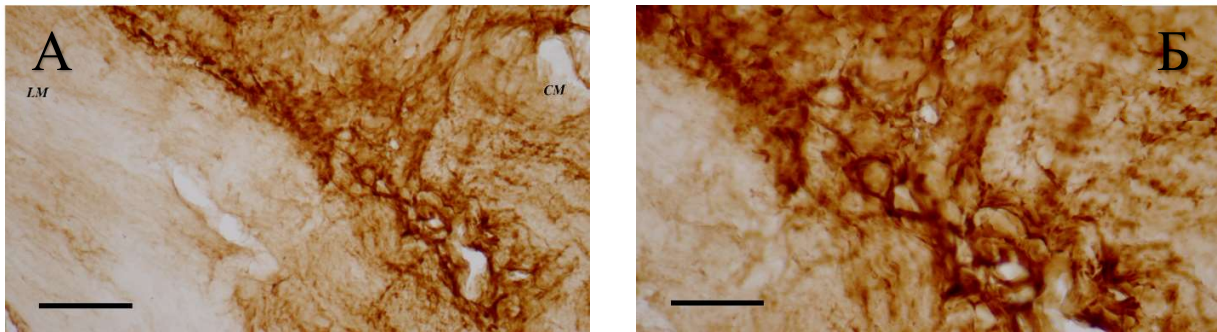


Фигура 130. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

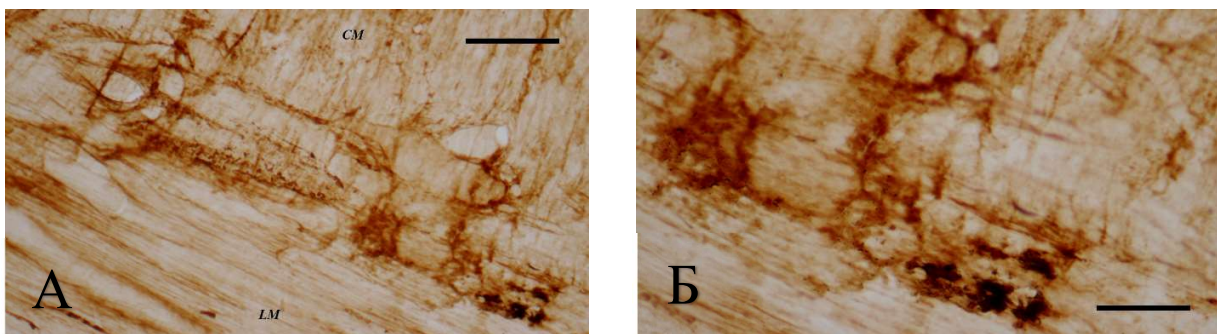


Фигура 131. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μ т, Б – 50 μ т.

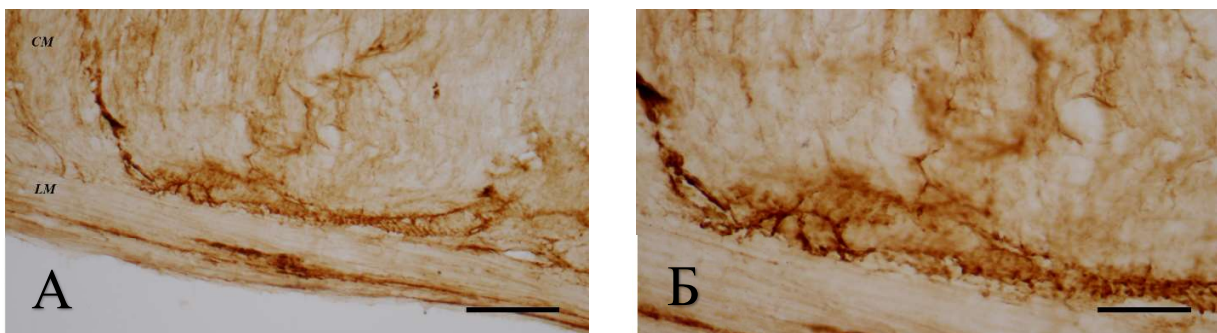
Собствени резултати



Фигура 132. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .



Фигура 133. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 50 μm .



Фигура 134. Имунохистохимично визуализиране на АТФ-синтаза в миентерични нервни структури на тангенциален срез от анален канал на плъх на малко (А) и голямо (Б) увеличение. Позитивната реакция се маркира в тъмнокафяво. СМ – ЦМП, LM – НМП. Размерна линия: А – 100 μm , Б – 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 4.

Данните, отнасящи се до структурите, свързани с МС бяха събрани при анализ на избрани анатомични области, характеризиращи се със запазена структура и липса на микроскопски артефакти. Измерванията, касаещи нервни 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 тестът на *Kruskal-Wallis*, който е непараметрична алтернатива на еднофакторния дисперсионен анализ за съпоставка на три и повече групи (извадки). Тестът на *Kruskal-Wallis*, използва 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 в отделните сегменти, при различна ориентация на среза през чревната стена (μm^2).
- Интензитет на имунореактивност на невроните в отделните сегменти при специфичните имунохистохимични реакции (сива скала 0 – 255).

5.1. Площ на миентералните неврони в отделните сегменти на КРО

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

Таблица 4. Полуколичествена оценка на експресията на невроактивни вещества в КРО на плъх.

Невроактивни вещества	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.

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

Сравнението на стойностите на медианите на площта в отделните сегменти показва по-големи размери в колона спрямо аноректалната област (табл. 5, 6 и 7). Прави впечатление, също така, че това е валидно при всички типове срезове: напречни, надлъжни и тангенциални (фиг. 135, 136, 137).

При сравнението на стойностите за един и същ сегмент, но с различна ориентация на среза е видно, че стойностите са най-ниски при надлъжните срезове (табл. 6, фиг. 136), средни по стойност са те при напречните (табл. 5, фиг. 135) и най-високи са при тангенциалните срезове (табл. 7, фиг. 137).

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

Сравнителният анализ на имунореактивността на миентералните неврони показва статистически значими различия в отделните сегменти на дебелото черво на плъха при повечето от проведените оцветявания. За яснота, измерените стойности са представени в таблици 8 – 12.

Собствени резултати

Сравнението на имунореактивността на холинергичните неврони показва статистически значими различия по хода на КРО. Тестът на *Kruskal-Wallis* показва статистически значими различия в интензитета на оцветяване на телата на невроните в изследваните части на колона, $H(3) = 16.79$, $p = 0.0008$. Тестът на *Dunn* показва значими различия в интензитета в проксималния и дисталния колон, $p < 0.05$ (фиг. 138).

По отношение на имунореактивността към SP, тестът на *Kruskal-Wallis* показва статистически значими различия 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* показва значими различия в интензитета 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. 139).

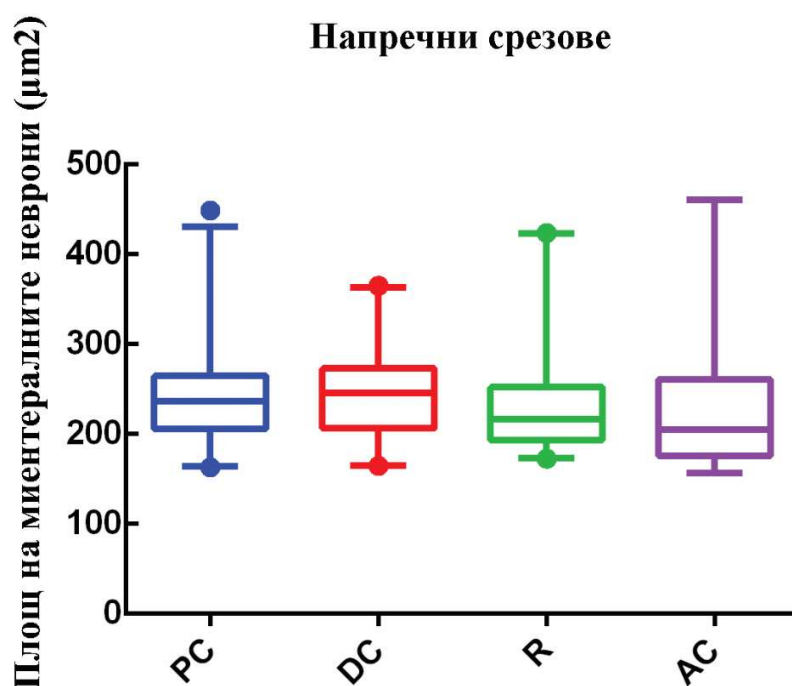
По отношение на имунореактивността за АТФ, тестът на *Kruskal-Wallis* не показва статистически значими различия в медианите при четирите изследвани групи, $H(3) = 5.495$, $p = 0.1389$ (фиг. 140).

По отношение на интензитета на оцветяване на NADPH-d-позитивни структури, непараметричния тест на *Kruskal-Wallis*, показва че медианите на проксималния колон ($Mdn = 152.737$), дисталния колон ($Mdn = 132.959$), ректума ($Mdn = 105.331$) и аналния канал ($Mdn = 72.640$) показват значими статистически различия, $H(3) = 105.239$, $p < 0.0001$ (фиг. 141). Тестът на *Dunn* разкри различия 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. 141).

По отношение на nNOS-позитивните структури, тестът на *Kruskal-Wallis* не показва статистически значими различия при експресията на NOS при четирите изследвани групи, $H(3) = 2.455$, $p = 0.4835$ (фиг. 142).

Таблица 5. Количествена характеристика на площта на миентералните неврони в μm^2 при напречни срезове в КРО на плъх.

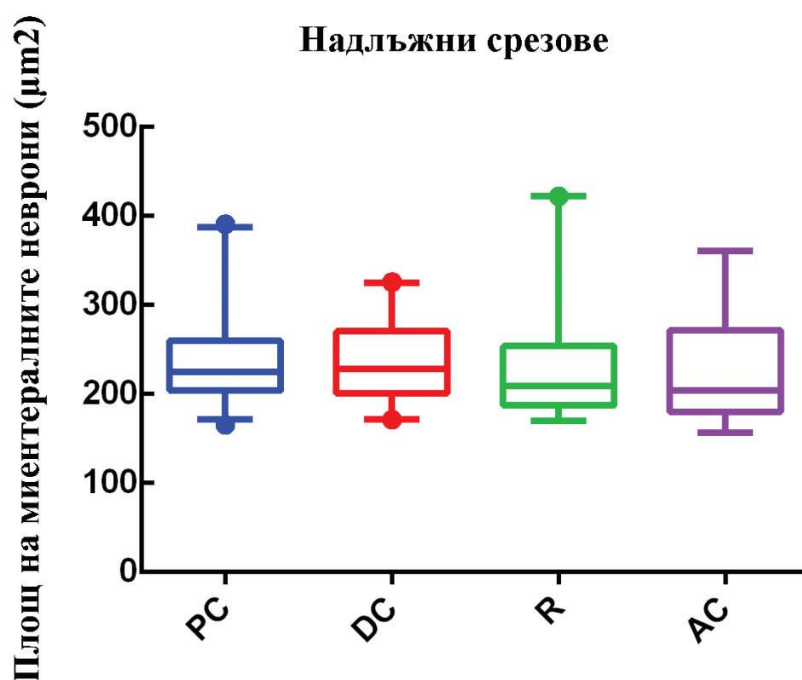
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	251,189	236,286	76,467	13,961
DC	248,302	245,900	52,107	11,652
R	237,100	216,527	67,417	14,373
AC	237,404	204,752	88,019	20,193



Фигура 135. 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%) квантил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност.. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 6. Количествена характеристика на площта на миентералните неврони в μm^2 при надлъжни срезове в КРО на плъх.

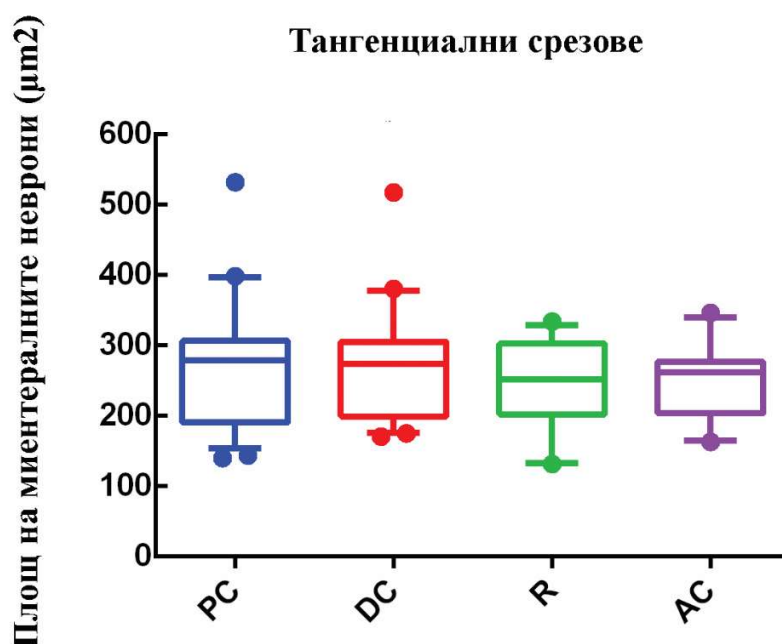
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	241,310	224,767	56,322	11,497
DC	236,262	228,306	46,035	10,046
R	227,540	209,298	59,386	13,624
AC	229,105	203,990	64,487	15,200



Фигура 136. 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%) квантил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност.. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 7. Количествена характеристика на площта на миентералните неврони в μm^2 при тангенциални срезове в КРО на плъх.

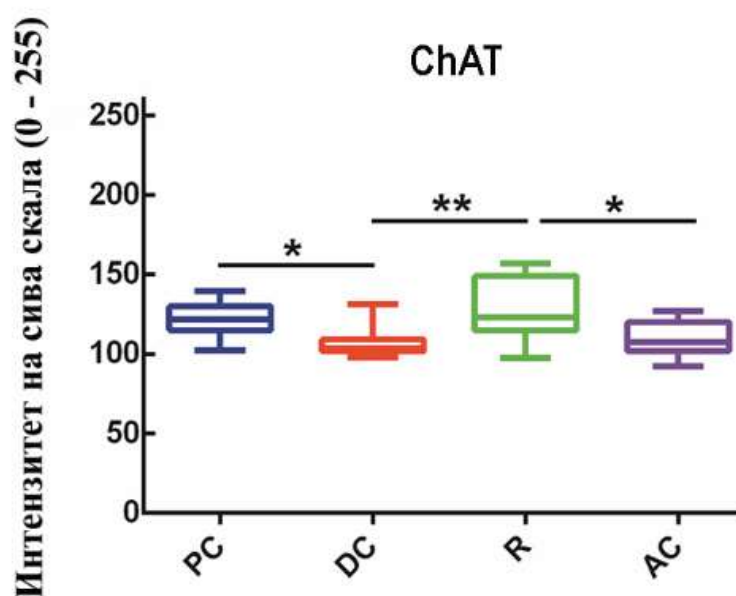
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	270,379	278,845	76,691	11,307
DC	269,420	273,599	71,818	11,082
R	249,803	252,221	58,787	11,757
AC	249,745	261,518	48,238	10,284



Фигура 137. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото 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%) квантил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност.. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 8. Количествени характеристики на интензитета на имунореактивност на холинергичните неврони по хода на КРО на плъх

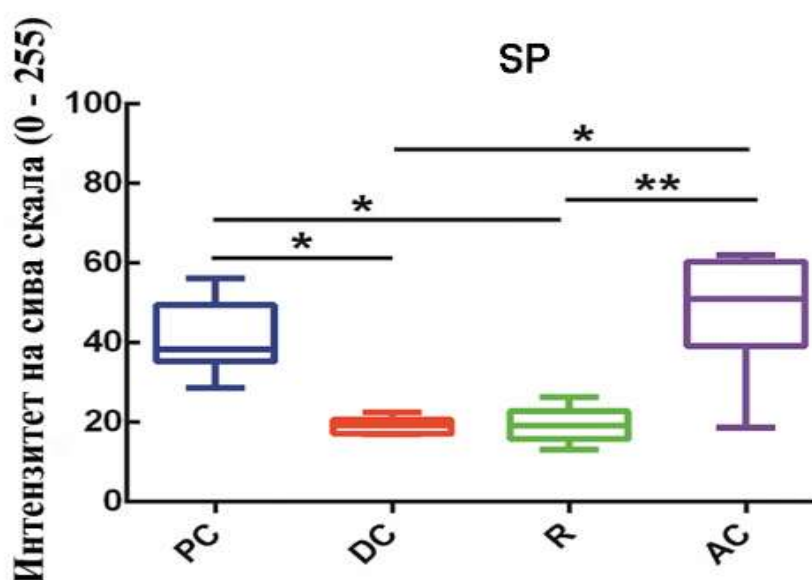
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	122,390	121,567	10,517	2,917
DC	106,785	103,449	8,882	2,463
R	127,703	123,092	19,563	5,426
AC	109,098	107,281	10,203	2,830



Фигура 138. 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%) квантил. 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 9. Количествени характеристики на интензитета на имунореактивност на нервните структури към SP по хода на КРО на плъх.

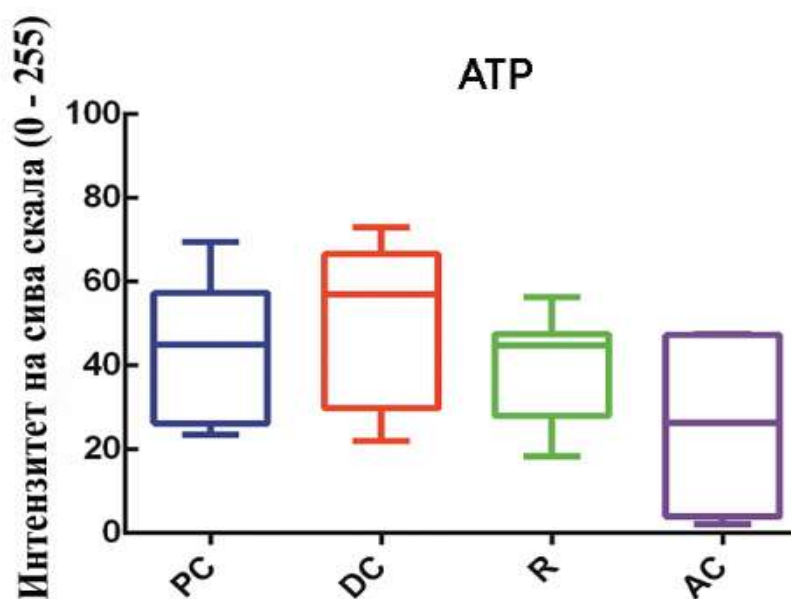
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	41,085	38,312	9,161	3,462
DC	19,258	19,201	2,133	0,806
R	19,369	19,156	4,364	1,649
AC	46,793	51,015	15,019	5,677



Фигура 139. 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%) квантил. 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 10. Количествени характеристики на интензитета на АТФ имунореактивност на нервните структури по хода на КРО на плъх.

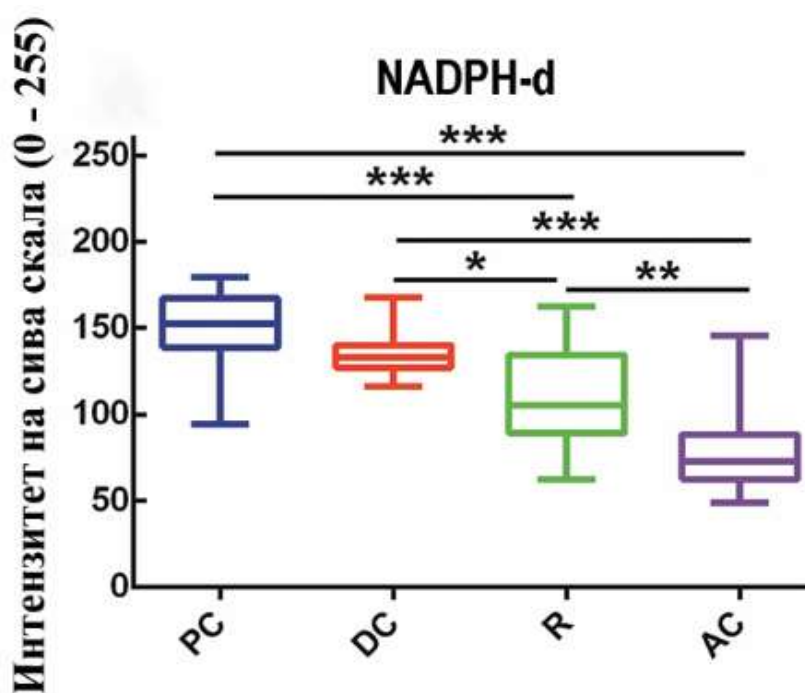
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	44,821	45,032	17,219	6,508
DC	50,779	57,056	18,951	7,163
R	39,764	44,764	12,956	4,897
AC	24,674	26,335	20,713	7,829



Фигура 140. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на имунореактивност на нервните 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%) квантил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

Таблица 11. Количествени характеристики на интензитета на оцветяване на нитрергичните нервни структури по хода на КРО на плъх.

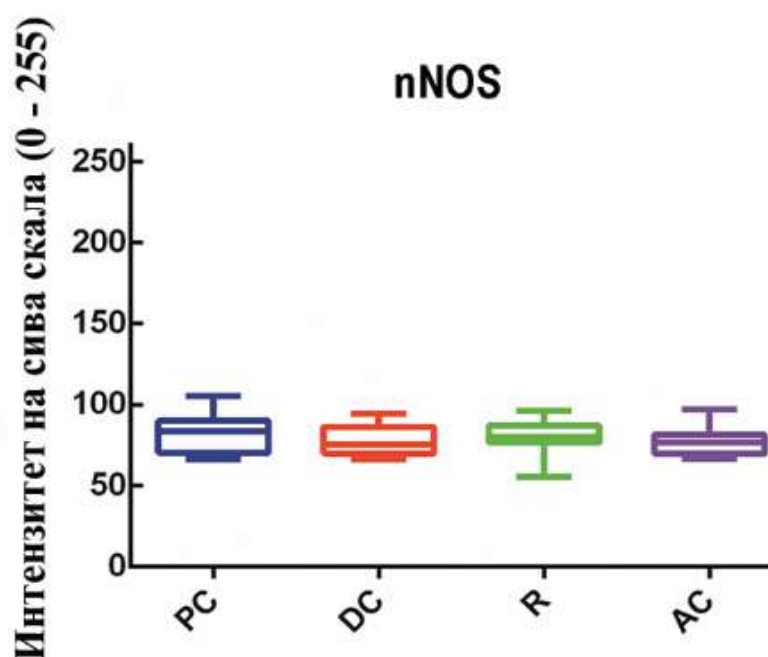
	Ср. стойност	Медиана	Ст. отклонение	Ст. грешка
PC	150,703	152,737	18,595	2,421
DC	136,814	132,959	14,462	2,783
R	110,897	105,331	28,684	4,653
AC	77,979	72,640	20,355	3,069



Фигура 141. 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%) квантил. 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 12. Количествени характеристики на имунореактивност на нервните структури към pNOS 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 142. Диаграма тип „кутия с мустачки“, отразяваща статистическото сравнение между интензитета на имунореактивност на нервните структури към pNOS по хода на КРО на плъх. Линиите в кутиите показват медианата, а долните и горните им граници – съответно първия (25%) и третия (75%) квантил. Мустачките отразяват минималната и максималната стойност. PC – проксимален колон, DC – дистален колон, R – ректум, AC – анален канал.

VI. 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 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 статистически 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. отпрепарирание на тъканта е от най-съществено значение за последващата

Обсъждане

визуализация на ганглиите и съставните им неврони. Съществуват два основни метода за обработка на чревната стена за изследване на ЕНС – на *wholemout* препарати и на тъканни срезове. Изготвянето на *wholemout* препарати с цел изследване на ентeралните 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. *Wholemout* 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 *wholemout* 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. Фотографските снимки на *wholemout* 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 рехават 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 ѝ 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, които 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 (табл. 1), 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 (табл. 1). Като обобщение можем да приемем, че въпреки ограниченията, резултатите от изследванията при плъх, проведени на срезове, 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 срезове, 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. Разликата 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, влизаци 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 (табл. 1). 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; Вауег 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, пурины 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 (табл. 1). 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 рефлексни, индуцирани от физиологични и патофизиологични стимули (Turvill и съавт. 2000; Larsson и съавт. 2008). По-конкретно, потвърдено е, че SP-медираната трансмисия участва в три невронални регулаторни системи.

При първата, SP е котрансмитер на възбудните миентерални мотоневрони, заедно с ацетилхолин (Llewellyn-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 пропульсивни чревни рефлексни. 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 литературния 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 показваха изразена имунореактивност към SP, както в самия MC, 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; Nens 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. Въпреки това, системата от реактивни 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; Норе и съавт. 1991). По тази причина, приемаме че получените

Обсъждане

резултати от изследванията ни с хистохимичната реакция за NADPH-d и имунохистохимичната реакция за nNOS се отнасят до една и съща невронална популация.

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 рефлексни в червата, тъй като nNOS е локализиран 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 (Vodi 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 редуция 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 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 наблюдаването 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 взаимоотношността 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 които могат да се наблюдават значими отклонения в количеството или активността на отделни невронални групи. Удачни примери за това са аганглиозата 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 неочветените 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 локализация 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. Куо 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 рефлексии 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; Норе 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.

Обсъждане

- 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 аганглиозата на *Hirschprung*.

VII. 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 съединителна тъкан, която е 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.

VIII. 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 нитергични 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), пурины (АТФ) и газови невропосредници (азотен оксид).

IX. 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)

Х. Участия в научни форуми

1. **Kirov T**, Atanasova D, Malinova L, Jeleв 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.

XI. Библиография

1. Давидов М (1982). Имуноцитохимични методи за изучаване на нервната система. В: Съвременни проблеми на невроморфологията, БАН.
2. Ставрева-Маринова Г (2012). Фармакологични аспекти на модулаторни и низходящи моторни отговори в ректоаналната област. *Дисертация*.
3. Adelson D, Lao L, Zhang G, Kim W, Marvizón JC (2009). Substance P release and neurokinin 1 receptor activation in the rat spinal cord increase with the firing frequency of C-fibers. *Neuroscience* 161(2):538-553.
4. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357(3):593-615.
5. Auerbach L (1862). Über einen Plexus gangliosis myogastricus. *Jahres-Bericht Abhandlung Schlesischen. Gesellschaft für Vaterlandische Cultur* 39(1):103-104.
6. Auerbach L (1864). Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie* 30(1):457-460.
7. Balemba O, Grøndahl M, Mbassa G, Semuguruka W, Hay-Smith A, Skadhauge E, Dantzer V (1998). The organization of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. *Journal of Anatomy* 192(2):257-267.
8. Barbiers M, Timmermans JP, Scheuermann DW, Adriaensen D, Mayer B, De Groodt-Lasseel MH (1993). Distribution and morphological features of nitrergic neurons in the porcine large intestine. *Histochemistry* 100(1):27-34.
9. Bauer V (1993). NANC transmission in intestines and its pharmacological modulation. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 53(1):65-77.
10. Bauer V, Matusak O, Kuriyama H (1982). Non-cholinergic, non-adrenergic responses to nerve stimulation of different regions of the guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 319(2):108-114.
11. Baumgarten HG, Holstein AF, Owman C (1970). Auerbach's plexus of mammals and man: electron microscopic identification of three different types of neuronal

Библиография

- processes in myenteric ganglia of the large intestine from Rhesus monkeys, guinea-pigs and man. *Zeitschrift für Zellforschung* 106(3):376-397.
12. Bayliss WM, Starling EH (1899). The movements and innervation of the small intestine. *Journal of Physiology, London* 24(2):99-143.
 13. Belai A, Burnstock G (1994). Evidence for coexistence of ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) inhibitory neurons in the rat ileum, colon and anococcygeus muscle. *Cell and Tissue Research* 278(1):197-200.
 14. Bennett M (1997). Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on. *Progress in Neurobiology* 52(3):159-195.
 15. Bertrand PP, Kunze WAA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *American Journal of Physiology* 273(2):422-435.
 16. Bertrand PP, Kunze WAA, Bornstein JC, Furness JB (1998). Electrical mapping of the projections of intrinsic primary afferent neurons to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterology and Motility* 10(6):533-541.
 17. Billroth T (1858). Einige Beobachtungen über das ausgedehnte Vorkommen von Nervenastomosen im Tractus Intestinalis. In: Müller J. *Archiv für Anatomie und Physiologie und Wissenschaftliche Medizin. Leipzig* Pp:148-158.
 18. Bódi N, Battonyai I, Talapka P, Fekete E, Bagyánszki M (2009). Spatial pattern analysis of nitrenergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. *Acta Biologica Hungarica* 60(4):347-358.
 19. Bornstein JC, Hendriks R, Furness JB, Trussell DC (1991). Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *Journal of Comparative Neurology* 314(3):437-451.
 20. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295):768-770.

Библиография

21. Brehmer A, Stach W, Krammer HJ, Neuhuber W (1998). Distribution, morphology and projections of nitrergic and non-nitrergic submucosal neurons in the pig small intestine. *Histochemistry and Cell Biology* 109(1):87-94.
22. Brehmer A, Schrodل F, Neuhuber W (1999a). Morphological classifications of enteric neurons – 100 years after Dogiel. *Anatomy and Embryology* 200(2):125-135.
23. Brehmer A, Schrodل F, Neuhuber W, Hens J, Timmermans JP (1999b). Comparison of enteric neuronal morphology as demonstrated by DiI-tracing under different tissue-handling conditions. *Anatomy and Embryology* 199(1):57-62.
24. Brehmer A, Blaser B, Seitz G, Schrodل F, Neuhuber W (2004a). Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. *Histochemistry and Cell Biology* 121(1):13-20.
25. Brehmer A, Croner R, Dimmler A, Papadopoulos T, Schrodл F, Neuhuber W (2004b). Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience* 112(1-2):49-59.
26. Brookes SJH, Steele PA, Costa M (1991). Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 42(3):863-878.
27. Brookes SJH, Song ZM, Ramsay GA, Costa M (1995). Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *Journal of Neuroscience* 15(5):4013-4022.
28. Bryant MG, Polak JM, Modlin I, Bloom SR, Albuquerque RH, Pearse AGE (1976). Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *The Lancet* 1(7967):991-993.
29. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345(6273):346-347.
30. Burnstock G (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews* 24(3):509-581.

Библиография

31. Burnstock G, Campbell G, Bennett MR, Holman ME (1964). Innervation of the guinea-pig taenia coli: are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves? *International Journal of Neuropharmacology* 3(1):163-166.
32. Burnstock G, Campbell G, Rand MJ (1966). The inhibitory innervation of the taenia of the guinea-pig caecum. *Journal of Physiology, London* 182(3):504-526.
33. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic nerves in the gut. *British Journal of Pharmacology* 40(4):668-688.
34. Burnstock G, Satchell DG, Smythe A (1972). A comparison of the excitatory and inhibitory effects of nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *British Journal of Pharmacology* 46(2):234-242.
35. Burnstock G, Fredholm BB, North RA, Verkhratsky A (2010). The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiologica (Oxford)* 199(2):93-147.
36. Campbell G (1966). The inhibitory nerve fibers in the vagal supply to the guinea-pig stomach. *Journal of Physiology, London* 185(3):600-612.
37. Campbell G (1970). Autonomic nervous supply to effector tissues. In: Bulbring E, Brading A, Jones A, Tomita T. *Smooth Muscle. Arnold, London* Pp. 451–495.
38. Cervero F (1994). Sensory innervation of the viscera: Peripheral basis of visceral pain. *Physiological Reviews* 74(1):95-138.
39. Christensen J, Rick GA (1985). Nerve cell density in submucous plexus throughout the gut of cat and opossum. *Gastroenterology* 89(5):1064-1069.
40. Christensen J, Rick GA (1987). Intrinsic nerves in the mammalian colon: confirmation of a plexus at the circular muscle-submucosal interface. *Journal of the Autonomic Nervous System* 21(2-3):223-231.
41. Christensen J, Stiles MJ, Rick GA, Sutherland J (1984). Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals. *Gastroenterology* 86(4):706-713.

Библиография

42. Cook RD, Burnstock G (1976a). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. Neuronal elements. *Journal of Neurocytology* 5(2):171-194.
43. Cook RD, Burnstock G (1976b). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. Non-neuronal elements. *Journal of Neurocytology* 5(2):195-206.
44. Costa M, Furness JB (1983). The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 8(4):665-676.
45. Costa M, Furness JB, Llewellyn Smith IJ, Cuello AC (1981). Projections of substance P-containing neurons within the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 6(3):411-424.
46. Costa M, Furness JB, Cuello AC, Verhofstad AA, Steinbusch HW, Elde RP (1982). Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their visualization and reactions to drug treatment. *Neuroscience* 7(2):351-363.
47. Costa M, Furness JB, Pompolo S, Brookes SJH, Bornstein JC, Bredt DS, Snyder SH (1992). Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience Letters* 148(1-2):121-125.
48. Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75(3):949-967.
49. Cracco C, Filogamo G (1994). Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience* 61(2):351-359.
50. Crowe R, Burnstock G (1990). The subserosal ganglia of the human taenia. *Neuroscience Letters* 119(2):203-206.
51. Cserni T, O'Donnell A, Paran S, Puri P (2009). Correlation of enteric NADPH-d positive cell counts with the duration of incubation period in NADPH-d histochemistry. *Pathology & Oncology Research* 15(1):103-107.

Библиография

52. Dalziel HH, Thornbury KD, Ward SM, Sanders KM (1991). Involvement of nitric oxide synthetic pathway in inhibitory junction potentials in canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 260(5):789-792.
53. Daniel EE, Furness JB, Costa M, Belbeck L (1987). The projections of chemically identified nerve fibres in canine ileum. *Cell and Tissue Research* 247(2):377-384.
54. Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88(17): 7797-7801.
55. Dogiel AS (1899). Uber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Leipzig* 1899(1):130-158.
56. Ekblad E, Winther C, Ekman R, Håkanson R, Sundler F (1987). Projections of peptide-containing neurons in rat small intestine. *Neuroscience* 20(1):169-188.
57. Ekblad E, Ekman R, Håkanson R, Sundler F (1988). Projections of peptide-containing neurons in rat colon. *Neuroscience* 27(2):655-674.
58. Eklund S, Jodal M, Lundgren O, Sjöqvist A (1979). Effects of vasoactive intestinal polypeptide on blood flow, motility and fluid transport in the gastrointestinal tract of the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 105(4):461-468.
59. Ellias SA, Stevens JK (1980). The dendritic varicosity: a mechanism for electrically isolating the dendrites of cat retinal amacrine cells? *Brain Research* 196(2):365-372.
60. Fahrenkrug J, Haglund U, Jodal M, Lundgren O, Olbe L, Schaffalitzky de Muckadell O (1978). Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide in the gastrointestinal tract of cats: possible physiological implications. *Journal of Physiology, London* 284(1):291-305.
61. Fang S, Wu R, Christensen J (1993). Intramucosal nerve cells in human small intestine. *Journal of the Autonomic Nervous System* 44(2-3):129-136.

Библиография

62. Faussone-Pellegrini MS, Cortesini C (1984). Ultrastructural peculiarities of the inner portion of the circular layer of colon. Research in the human. *Acta Anatomica* 120(4):185-189.
63. Faussone-Pellegrini MS (1985). Ultrastructural peculiarities of the inner portion of the circular layer of the colon. Research on the mouse. *Acta Anatomica* 122(3):187-192.
64. Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ, Polak JM (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297(5865):409-410.
65. Fink S (1959). The intraluminal pressures in the intact human intestine. *Gastroenterology* 36(5):661-671.
66. Fukai K, Fukuda H (1984). The intramural pelvic nerves in the colon of dogs. *Journal of Physiology* 354(1):80-98.
67. Furness JB (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81(1-3):87-96.
68. Furness JB (2006). The enteric nervous system. *Blackwell Publishing, Oxford* Pp:3-28
69. Furness JB, Costa M (1973). The nervous release and the action of substances which affect intestinal muscle through neither adrenoreceptors nor cholinoreceptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London* 265(867):123-133.
70. Furness JB, Costa M (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5(1):1-20.
71. Furness JB, Costa M (1987). The Enteric Nervous System. *Churchill Livingstone, Edinburgh*.
72. Furness JB, Bornstein JC (1991). The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Yamada T. Textbook of Gastroenterology. *J.B. Lippincott Company, Philadelphia* pp. 2–24.

Библиография

73. Furness JB, Costa M, Eckenstein F (1983). Neurons localized with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. *Neuroscience Letters* 40(2):105-109.
74. Furness JB, Costa M, Keast JR (1984). Choline acetyltransferase and peptide immunoreactivity of submucous neurons in the small intestine of the guinea-pig. *Cell and Tissue Research* 237(2):329-336.
75. Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Maley BE, Storm Mathisen J (1989). Shapes and projections of neurons with immunoreactivity for gammaaminobutyric acid in the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research* 256(2):293-301.
76. Furness JB, Lloyd KC, Sternini C, Walsh JH (1990a). Projections of substance P, vasoactive intestinal peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special reference to the innervation of the circular muscle. *Archives of Histology and Cytology* 53(2):129-140.
77. Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Smith TK (1990b). Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell and Tissue Research* 260(2):261-272.
78. Furness J, Lloyd K, Sternini C, Walsh JH (1991). Evidence that myenteric neurons of the gastric corpus project to both the mucosa and the external muscle: myectomy operations on the canine stomach. *Cell and Tissue Research* 266(3):475-481.
79. Furness JB, Bornstein JC, Pompolo S, Young HM, Kunze WA, Kelly H (1994a). The circuitry of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility* 6(1):241-253.
80. Furness JB, Li ZS, Young HM, Förstermann U (1994b). Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell and Tissue Research* 277(1):139-149.
81. Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WAA, McConalogue K (1995). Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology* 108(2):554-563.

Библиография

82. Furness J, Clerc N, Gola M, Kunze, WA Fletcher E (2000). Identification of component neurons and organization of enteric nerve circuits. In: Krammer HJ. Neurogastroenterology – from the basics to the clinics, *Kluwer Academic, Dordrecht* pp:134-147.
83. Furness JB, Alex G, Clark MJ, Lal VV (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *Anatomical Record, Part A, Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology* 272(2):475-483.
84. Furness JB, Robbins HL, Xiao J, Stebbing MJ, Nurgali K (2004). Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell and Tissue Research* 317(1):1-12.
85. Gabella G (1971). Glial cells in the myenteric plexus. *Zeitschrift für Naturforschung* 26(3):244-245.
86. Gabella G (1972a). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of Anatomy* 111(1):69-97.
87. Gabella G (1972b). Innervation of the intestinal muscular coat. *Journal of Neurocytology* 1(4):341-362
88. Gabella G (1974). Special muscle cells and their innervation in the mammalian small intestine. *Cell and Tissue Research* 153(1):63-77.
89. Gabella G (1981a). Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: Physiology of the gastrointestinal tract. *Raven Press, New York* pp:197-241.
90. Gabella G (1981b). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6(3):425-436.
91. Gabella G, Trigg P (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *Journal of Neurocytology* 13(1):49-71.
92. George SJ, Johnson JL (2012). Extracellular Matrix and Smooth Muscle Cells. In: Wick G, Grundtman C. Inflammation and Atherosclerosis. *Springer, Vienna* pp. 435-460.

Библиография

93. Gonkowski S (2013). Substance P as a neuronal factor in the enteric nervous system of the porcine descending colon in physiological conditions and during selected pathogenic processes. *BioFactors* 39(5):542-551.
94. Grider JR (1989). Tachykinins as transmitters of ascending contractile component of the peristaltic reflex. *American Journal of Physiology* 257:709-714.
95. Grider JR, Katsoulis S, Schmidt WE, Jin JG (1994). Regulation of the descending relaxation phase of intestinal peristalsis by PACAP. *Journal of the Autonomic Nervous System* 50(2):151-159.
96. Grundy D, Scratcherd T (1989). Sensory afferents from the gastrointestinal tract. In: Wood JD. Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System, Volume 16. *American Physiological Society, Washington, DC* pp. 593-620.
97. Gunn M (1968). Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *Journal of Anatomy* 102(2):223-239.
98. Hanani M, Louzon V, Udassin R, Freund HR, Karmeli F, Rachmilewitz D (1995). Nitric oxide-containing nerves in bowel segments of patients with Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery* 30(6):818-822.
99. Hanani M, Ermilov LG, Schmalz PF, Louzon V, Miller SM, Szurszewski JH (1998). The three-dimensional structure of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Journal of the Autonomic Nervous System* 71(1):1-9.
100. Hanani M, Grossman S, Nissan A, Eid A (2012). Morphological and quantitative study of the myenteric plexus in the human tenia coli. *Anatomical Record, Hoboken* 295(8):1321-1326.
101. Heinicke E, Kiernan J (1990). An immunohistochemical study of the myenteric plexus of the colon in the rat and mouse. *Journal of Anatomy* 170(1):51-62.
102. Hendriks R, Bornstein JC, Furness JB (1990). An electrophysiological study of the projections of putative sensory neurons within the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Neuroscience Letters* 110(3):286-290.
103. Henle J (1871). Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Band III, Abt. 2. Nervenlehre. *Vieweg und Sohn, Braunschweig*.

Библиография

104. Hens J, Schrodل F, Brehmer A, Adriaensen D, Neuhuber W, Scheuermann DW, Schemann M, Timmermans JP (2000). Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *Journal of Comparative Neurology* 421(3):426-436.
105. Hens J, Vanderwinden J-M, De Laet MH, Scheuermann DW, Timmermans JP (2001). Morphological and neurochemical identification of enteric neurons with mucosal projections in the human small intestine. *Journal of Neurochemistry* 76(2):464-471.
106. Hens J, Gajda M, Scheuermann D, Adriaensen D, Timmermans JP (2002). The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucous neurons. *Histochemistry and Cell Biology* 117(6):481-492.
107. Hill CJ (1927). A contribution to our knowledge of the enteric plexuses. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London* 215:355-387.
108. Hirakawa H, Kobayashi H, O'Briain DS, Puri P (1995). Absence of NADPH-diaphorase activity in internal anal sphincter (IAS) achalasia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 20(1):54-58.
109. Holzer P, Holzer-Petsche U (1997). Tachykinins in the gut. Part 1. Expression, release and motor function. *Pharmacology and Therapeutics* 73(3):173-217.
110. Hope BT, Michaels G, Krigge KM, Vincent SR (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88(7)2811-2814.
111. Hoyle CH, Burnstock G (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of Anatomy* 166(1):7-22.
112. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29(4):577-80.
113. Hwang SJ, Durnin L, Dwyer L, Rhee PL, Ward SM, Koh SD, Sanders KM, Mutafova-Yambolieva VN (2011). Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an

Библиография

- enteric inhibitory neurotransmitter in human and nonhuman primate colons. *Gastroenterology* 140(2):608-617.
114. Irwin D (1931). The anatomy of the Auerbach plexus. *American Journal of Anatomy* 49(1):141-166.
 115. Ivancheva C, Itzev D, Lolova I, Radomirov R (1998). Contribution of nitric oxide and substance P to nonadrenergic, noncholinergic transmission in the guinea pig ileum. *General Pharmacology* 31(1):101-105.
 116. Iyer V, Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Takahashi Y, Iwanaga T (1988). Electrophysiology of guinea-pig myenteric neurons correlated with immunoreactivity for calcium binding proteins. *Journal of the Autonomic Nervous System* 22(2):141-150.
 117. Izumi N, Matsuyama H, Yamamoto Y, Atoji Y, Suzuki Y, Unno T, Takewaki T (2002). Morphological and morphometrical characteristics of the esophageal intrinsic nervous system in the golden hamster. *European Journal of Morphology* 40(3):137-144.
 118. Jacobs JM (1977). Penetration of systemically injected horseradish peroxidase into ganglia and nerves of the autonomic nervous system. *Journal of Neurocytology* 6(5):607-618.
 119. Jessen KR, Mirsky R (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary protein. *Nature* 286(5774):736-737.
 120. Jessen KR, Mirsky R (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *Journal of Neuroscience* 3(11):2206-2218.
 121. Johnson PJ, Bornstein JC, Yuan SY, Furness JB (1996). Analysis of contributions of acetylcholine and tachykinins to neuro-neuronal transmission in motility reflexes in the guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology* 118(4):973-983.
 122. Kirchgessner AL, Gershon MD (1988). Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by

Библиография

- retrograde and anterograde transport. *Journal of Comparative Neurology* 277(4):487-498.
123. Komuro T, Baluk P, Burnstock G (1982). An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7(7):1797-1806.
124. Kubikova E, Sivakova I, Falougy HE, Perzelova A (2018). Subserosal localization of myenteric ganglia in normal human appendix: immunostaining with neuronal and glial markers. *Bratislava Medical Journal* 119(12):743-746.
125. Kunze WAA, Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annual Review of Physiology* 61(1):117-142.
126. Kunze WAA, Furness JB, Bornstein JC (1993). Simultaneous intracellular recordings from enteric neurons reveal that myenteric AH neurons transmit via slow excitatory postsynaptic potentials. *Neuroscience* 55(3):685-694.
127. Kunze WAA, Bornstein JC, Furness JB (1995). Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ, the intestine of a mammal. *Neuroscience* 66(1):1-4.
128. Kunze WAA, Furness JB, Bertrand PP, Bornstein JC (1998). Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *Journal of Physiology* 506(3):827-842.
129. Kunze WAA, Clerc N, Bertrand PP, Furness JB (1999). Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *Journal of Physiology* 517(2):547-561.
130. Kunze WAA, Clerc N, Furness JB, Gola M (2000). The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. *Journal of Physiology* 526(2):375-385.
131. Kuo H, Grant S, Muth N, Hengemihle J, Ingram DK (1994). The correlation between neuron counts and optical density of NADPH-diaphorase histochemistry in the rat striatum: a quantitative study. *Brain Research* 660(1):57-65.
132. Kyösola K, Veijola L, Rechart L (1975). Cholinergic innervation of the gastric wall of the cat. *Histochemistry* 44(1):23-30.

Библиография

133. Langley JN (1903). The autonomic nervous system. *Brain* 26(1):1-26.
134. Larsson M, Sapnara M, Thomas E, Bornstein J, Lindström E, Svensson D, Sjövall H (2008). Pharmacological analysis of components of the change in transmural potential difference evoked by distension of rat proximal small intestine in vivo. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 294(1):165-173.
135. Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V (2012). Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral Cortex* 22(5):1203-1214.
136. Lazarov N, Itzev D, Usunoff K, Negrev N, Radomirov R (2009). Changes in substance P-immunoreactive nerve structures of the rat recto-anal region in aging. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences* 62(8):1047-1052.
137. Li PL (1940). The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. *Journal of Anatomy* 74(3):348-359.
138. Lippi A, Santicioli P, Criscuoli M, Maggi CA (1998). Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 357(3):245-251.
139. Llewellyn-Smith IJ, Furness JB, Gibbins I, Costa M (1988). Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea-pig small intestine. *Journal of Comparative Neurology* 272(1):139-148.
140. Llewellyn-Smith IJ, Furness JB, Costa M (1989). Ultrastructural analysis of substance P-immunoreactive nerve fibers in myenteric ganglia of guinea pig small intestine. *Journal of Neuroscience* 9(1):167-174.
141. Llewellyn-Smith IJ, Costa M, Furness JB, Bornstein JC (1993). Structure of the tertiary component of the myenteric plexus in the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research* 272(3):509-516.

Библиография

142. Lomax AEG, Sharkey KA, Bertrand PP, Low AM, Bornstein JC, Furness JB (1999). Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *Journal of the Autonomic Nervous System* 76(1):45-61.
143. Lomax AE, Furness JB (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell and Tissue Research* 302(1):59-73.
144. Maifrino L, Liberti E, De Souza R (2007). Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the mouse colon. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 24(3):192-195.
145. Makhoulouf GM, Grider JR (1993). Nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitters of the gut. *News in Physiological Sciences* 8(5):196–199.
146. Mantyh PW, Allen CJ, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Liu H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE (1995). Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92(7):2622-2626.
147. Marvizón JC, Eskandari S, Ennes HS, Mayer EA (1998). Substance P induces brief, localized increase in Ca²⁺ in dorsal horn neurons. *Neuroreport* 9(15):3369-3374.
148. Mazzuoli G, Mazzoni M, Albanese V, Clavenzani P, Lalatta-Costerbosa G, Lucchi M, Furness JB, Chiocchetti R (2007). Morphology and neurochemistry of descending and ascending myenteric plexus neurons of sheep ileum. *Anatomical Record, Hoboken* 290(12):1480-1491.
149. McConalogue K, Furness JB (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8(1):51-76.
150. McConalogue K, Lyster DJK, Furness JB (1995). Electrophysiological analysis of the actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in the taenia of the guinea-pig caecum. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 352(5):538-544.
151. McConalogue K, Todorov L, Furness JB, Westfall DP (1996). Direct measurement of the release of ATP and its major metabolites from the nerve fibers of the guinea-

Библиография

- pig taenia coli. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23(9):807-812.
152. McNeil RS, Swann JW, Brinkley BR, Clark GD (1999). Neuronal cytoskeletal alterations evoked by a platelet-activating factor (PAF) analogue. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 43(2):99-113.
153. McRorie J, Krier J, Adams T (1991). Morphology and projections of myenteric neurons to colonic fiber bundles of the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 32(3):205-216.
154. Meier-Ruge W, Bruder E (2008). Current concepts of enzyme histochemistry in modern pathology. *Pathobiology* 75(4):233-243.
155. Meissner G (1857). Über die Nerven der Darmwand. *Zeitschrift für Rationelle Medizin* 8(1):364-366.
156. Messenger JP, Furness JB (1990). Projections of chemically-specified neurons in the guinea-pig colon. *Archives of Histology and Cytology* 53(5):467-95.
157. Michel K, Reiche D, Schemann M (2000). Projections and neurochemical coding of motor neurons to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig gastric corpus. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 440(3):393-408.
158. Mitsui R (2011). Immunohistochemical analysis of substance P-containing neurons in rat small intestine. *Cell and Tissue Research* 343(2):331-341.
159. Murofushi H, Suzuki M, Sakai H, Kobayashi S (1989). Immunohistochemical localization of microtubule-associated proteins in the nervous system of the small intestine of guinea pig. *Cell and Tissue Research* 255(2):315-322.
160. Mutafova-Yambolieva VN, Hwang SJ, Hao X, Chen H, Zhu MX, Wood JD, Ward SM, Sanders KM (2007). Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(41):16359-16364.
161. Neuhuber WL, Appelt M, Polak JM, Baier K, Kustermann W, Abelli L, Ferri GL (1993). Rectospinal neurons: cell bodies, pathways, immunocytochemistry and ultrastructure. *Neuroscience* 56(2):367-378.

Библиография

162. Neunlist M, Schemann M (1997). Projections and neurochemical coding of myenteric neurons innervating the mucosa of the guinea pig proximal colon. *Cell and Tissue Research* 287(1):119-125.
163. Newson B, Ahlman H, Dahlström A, Das Gupta T, Nyhus L (1979). Are there sensory neurons in the mucosa of the mammalian gut? *Acta Physiologica Scandinavica* 105(4):521-523.
164. Nichols K, Krantis A, Staines W (1992). Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea-pig intestine. *Neuroscience* 51(4):791-799.
165. Nurgali K, Furness JB, Stebbing MJ (2003). Correlation of electrophysiology, shape and synaptic properties of myenteric AH neurons of the guinea-pig distal colon. *Autonomic Neuroscience* 103(1-2):50-64.
166. Nurgali K, Stebbing MJ, Furness JB (2004). Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *Journal of Comparative Neurology* 468(1):112-124.
167. Ono M (1967). Electron microscopic observations on the ganglia of Auerbach's plexus and autonomic nerve endings in muscularis externa of the mouse small intestine. *Sapporo Medical Journal* 32(1):56-74.
168. Pataky D, Curtis S, Buchan A (1990). The co-localization of neuropeptides in the submucosa of the small intestine of normal Wistar and non-diabetic BB rats. *Neuroscience* 36(1):247-254.
169. Paton WDM, Zar MA (1968). The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *Journal of Physiology, London* 194(1):13-33.
170. Pfannkuche H, Reiche D, Sann H, Schemann M (1998). Different subpopulations of cholinergic and nitrergic myenteric neurons project to mucosa and circular muscle of the guinea-pig gastric fundus. *Cell and Tissue Research* 292(3):463-475.

Библиография

171. Polidoro G, Giancola F, Fracassi F, Pietra M, Bettini G, Asti M, Chiocchetti R (2017). Substance P and the neurokinin-1 receptor expression in dog ileum with and without inflammation. *Research in Veterinary Science* 114(1):297-307.
172. Pompolo S, Furness JB (1988). Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *Journal of Neurocytology* 17(6):771-782.
173. Pompolo S, Furness JB (1993). Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine. *Journal of Neurocytology* 22(7):531-546.
174. Pompolo S, Furness JB (1998). Quantitative analysis of inputs to somatostatin immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research* 294(2):219-226
175. Portbury AL, Pompolo S, Furness JB, Stebbing MJ, Kunze WA, Bornstein JC, Hughes S (1995). Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. *Journal of Anatomy* 187(2):303-321.
176. Porter A, Wattoo D, Brookes S, Costa M (1999). Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 14(12):1180-1187.
177. Purves D, Lichtman JW (1985). Geometrical differences among homologous neurons in mammals. *Science* 228(4697):298-302.
178. Purves D, Rubin E, Snider WD, Lichtman J (1986). Relation of animal size to convergence, divergence, and neuronal number in peripheral sympathetic pathways. *Journal of Neuroscience* 6(1):158-163.
179. Radke R, Weib R, Stach W (1978). Die Nervenzellen in der Magenwand. Eine lichtmikroskopische Untersuchung an Laboratoriumstieren. *Deutsche Zeitschrift für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten* 38(4):145-154.

Библиография

180. Rand MJ (1992). Nitrenergic transmission: Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 19(3):147-169.
181. Rash R, Thomas M (1962). The intrinsic innervation of the gastro-oesophageal and pyloro-duodenal junctions. *Journal of Anatomy* 96(3):389-396.
182. Ren J, Bertrand P (2008). Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signalling* 4(3):255-266.
183. Richardson KC (1958). Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *American Journal of Anatomy* 103(1):99-135.
184. Rutherford A, Burnstock G (1978). Neuronal and non-neuronal components in the overflow of labelled adenyly compounds from guinea-pig taenia coli. *European Journal of Pharmacology* 48(2):195-202.
185. Sanders K, Smith T (1986). Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. *Journal of Physiology* 380:293-310.
186. Sanders KM, Ward SM (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *American Journal of Physiology* 262(3):379-392.
187. Santer RM, Baker DM (1988). Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 25(1):59-67.
188. Schabadasch A (1930a). Die Nerven des Magens der Katze. *Zeitschrift für Zellforschung* 10(1):254-319.
189. Schabadasch A (1930b). Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs. *Zeitschrift für Zellforschung* 10(1):320-385.
190. Schemann M, Schaaf C, Mader M (1995). Neurotransmitter coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *Journal of Comparative Neurology* 353(2):161-178.

Библиография

191. Schemann M, Reiche D, Michel K (2001). Enteric pathways in the stomach. *Anatomical Record* 262(1):47-57.
192. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG (1983). Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *Journal of Neuroscience Methods* 9(3):229-234.
193. Scheuermann DW, Stach W, Timmermans JP (1987a). Topography, architecture and structure of the plexus submucosus internus (Meissner) of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta Anatomica, Basel* 129(2):96-104.
194. Scheuermann DW, Stach W, Timmermans JP (1987b). Topography, architecture and structure of the plexus submucosus externus (Schabadasch) of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta Anatomica, Basel* 129(2):105-115.
195. Scheuermann DW, Stach W, Timmermans JP, Adriaensen D, Barbiers M, Murofushi H, De Groodt-Lasseel MH (1991). Immunohistochemical visualization of the nervous system in the porcine small intestine using antisera raised against the cytoskeletal proteins MAP1 and MAP2 in combination with neuropeptide immunocytochemistry. *European Journal of Morphology* 29(3):219-231.
196. Sokolowa ML (1931). Zur Lehre von der Cytoarchitektonik des peripherischen autonomen Nervensystems. II. Die Architektur der intramuralen Ganglien des Verdauungstrakts des Rindes. *Zeitschrift für Mikroskopische Anatomische Forschung* 23:552-570.
197. Song ZM, Brookes SJH, Costa M (1991). Identification of myenteric neurons which project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neuroscience Letters* 129(2):294-298.
198. Song ZM, Brookes SJH, Steele PA, Costa M (1992). Projections and pathways of submucous neurons to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research* 269(1):87-98.

Библиография

199. Song ZM, Brookes SJH, Costa M (1994). All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neuroscience Letters* 180(2):219-222.
200. Song ZM, Brookes SJH, Ramsay GA, Costa M (1997). Characterization of myenteric interneurons with somatostatin immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 80(3):907-923.
201. Song ZM, Costa M, Brookes SJH (1998). Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine. *Journal of Comparative Neurology* 399(2):255-265.
202. Stach W (1980). Neuronal organization of the myenteric plexus (Auerbach) in the small intestine of the pig. Type I neurons. *Zeitschrift für Mikroskopisch Anatomische Forschung* 94(5):833-849.
203. Stach W (1981). Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus Auerbach im Schweinedunndarm. Typ II-neurone. *Zeitschrift für Mikroskopische Anatomische Forschung* 95:161-192.
204. Stach W (1982a). Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedunndarm III. Typ III-Neurone. *Zeitschrift für Mikroskopische Anatomische Forschung* 96:497-516.
205. Stach W (1982b). Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedunndarm. Typ IV-Neurone. *Zeitschrift für Mikroskopische Anatomische Forschung* 96:972-994.
206. Stach W (1985). Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus Auerbach im Schweinedunndarm. Type V-neurone. *Zeitschrift für Mikroskopische Anatomische Forschung* 99:562-582.
207. Stach W (1989). A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: Singer MV, Goebell H. Nerves and the Gastrointestinal Tract. *MTP Press, Lancaster, UK* Pp:29–45.
208. Stach W, Krammer HJ, Brehmer A (2000). Structural organization of enteric nerve cells in large mammals including man. In: Krammer HJ, Singer MV.

Библиография

- Neurogastroenterology - from the Basics to the Clinics. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands* Pp:3–20.
209. Stebbing MJ, Bornstein JC (1996). Electrophysiological mapping of fast excitatory synaptic inputs to morphologically and chemically characterized myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 73(4):1017-1028.
210. Stöhr P (1934) Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. *Zeitschrift für Zellforschung* 21(1):243-278.
211. Stöhr P (1952). Synopsis of research results on the microscopic innervation of the gastrointestinal tract. *Ergebnisse der Anatomie* 34(1):250–401.
212. Studer RO, Trzeciak A, Lergier W (1973). Isolierung und Aminosäuresequenz von substanz P aus Pferdedarm. *Helvetica Chimica Acta* 56(1):860-866.
213. Szurszewski JH, Miller SM (1994). Physiology of prevertebral ganglia. In: Johnson LR. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York Pp:795-877.
214. Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM (2002). Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurons. *Gut* 51(1):6-10.
215. Tabatabai M, Booth AM, De Groat WC (1986). Morphological and electrophysiological properties of pelvic ganglion cells in the rat. *Brain Research* 382(1):61-70.
216. Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM (1991). Nitric oxide and nitrosocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 261(3):553-557.
217. Thornton PDJ, Bornstein JC (2002). Slow excitatory synaptic potentials evoked by distension in myenteric descending interneurons of guinea-pig ileum. *Journal of Physiology* 539(2):589-602.
218. Timmermans JP, Barbiers M, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, De Groodt Lasseel MHA (1993). Occurrence, distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *Cell and Tissue Research* 272(1):49-58.

Библиография

219. Timmermans JP, Barbiere M, Scheuermann D, Stach W, Adriaensen D, Mayer B, De Groodt-Lasseel M (1994). Distribution pattern, neurochemical features and projections of nitrergic neurons in the pig small intestine. *Annals of Anatomy* 176(6):515-525.
220. Timmermans JP, Adriaensen D, Cornelissen W, Scheuermann D (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 118(2):331-240.
221. Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D (2001). Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anatomical Record* 262(1):71-78.
222. Trendelenburg P (1917). Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dunndarmperistaltik. *Naunyn Schmiedeberg's Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 81(1):55-129.
223. Turvill J, Connor P, Farthing M (2000). Neurokinin 1 and 2 receptors mediate cholera toxin secretion in rat jejunum. *Gastroenterology* 119(4):1037-1044.
224. Vanden Berghe P, Coulie B, Tack J, Mawe GM, Schemann M, Janssens J (1999). Neurochemical coding of myenteric neurons in the guinea-pig antrum. *Cell and Tissue Research* 297(1):81-90.
225. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH (1992). Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *The New England Journal of Medicine* 327(8):511-515.
226. Vogalis F, Hillsley K, Smith T (2000). Recording ionic events from cultured, DiI-labelled myenteric neurons in the guinea-pig proximal colon. *Journal of Neuroscience* 96(1):25-34.
227. Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Bredt DS, Snyder SH, Sanders KM (1992). NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 263(2):277-284.

Библиография

228. Wardell CF, Bornstein JC, Furness JB (1994). Projections of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive neurons in guinea-pig distal colon. *Cell and Tissue Research* 278(2):379-387.
229. Williamson S, Pompolo S, Furness JB (1996). GABA and nitric oxide synthase immunoreactivities are colocalized in a subset of inhibitory motor neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research* 284(1):29-37.
230. Wilson AJ, Llewellyn-Smith IJ, Furness JB, Costa M (1987). The source of the nerve fibers forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig. *Cell and Tissue Research* 247(3):497-504.
231. Wood JD (1994). Physiology of the enteric nervous system. In: Johnson LR. Physiology of the Gastrointestinal Tract. *Raven Press, New York* pp. 423-482.
232. Yamamoto M (1977). Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and the interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and bat. *Archivum Histologicum Japonicum* 40(3):171-201.
233. Yang P, Gandahi JA, Zhang Q, Zhang L, Bian X, Wu L, Liu Y, Chen Q (2013). Quantitative changes of nitrergic neurons during postnatal development of chicken myenteric plexus. *Journal of Zhejiang University: Science B* 14(10):886-895
234. Young HM, Furness JB (1995). An ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea-pig small intestine. *Journal of Comparative Neurology* 356(1):101-114.
235. Young HM, Furness JB, Povey JM (1995). Analysis of connections between nitric oxide synthase neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Journal of Neurocytology* 24(4):257-263.
236. Zoli M (2000). Distribution of cholinergic neurons in the mammalian brain with special reference to their relationship with neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In: Clementi F, Fornasari D, Gotti C. Neuronal nicotinic receptors. Handbook of experimental pharmacology, Volume 144. *Springer, Berlin, Heidelberg* Pp:13-30.

XII. 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. Thus, it includes a neuronal network with neurochemical coding of astonishing complexity. This plexus possesses the entire array of neuronal functional types, including a well-formed population of excitatory and inhibitory motor neurons, intrinsic primary afferent neurons and a wide variety of interneurons. 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.

Studies support the idea that ACh and NANC transmitters are responsible for the entire functional integrity of the healthy digestive system and there exists compelling evidence that this neuronal population is also involved in a variety of digestive disorders, including inflammatory bowel disease and Hirschprung's aganglionosis.

The current knowledge on the intestinal part of the myenteric plexus is primarily based upon gastrointestinal research on guinea pigs as models for humans. However, rodents are the most commonly used species for biomedical research because they are very similar to humans genetically. Moreover, studies conducted on rats have been focused at the small intestine, with the colonic and anorectal regions remaining relatively unexamined. 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.

Summary

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.

It has been reported that ACh mediates information in excitatory motor neurons and various subpopulations of myenteric interneurons. In this study, we provide evidence that the cholinergic neurons are a well-established neuronal population in the rat colon. Moreover, we registered minor local differences in the expression alongside the colorectal region.

In terms of NANC transmission, the main neuroactive substances involved are nitric oxide (NO), tachykinins, mostly substance P (SP) and adenosine triphosphate (ATP), co-localized in variable proportions with other neuroactive substances.

The concept that NO is much involved in the inhibitory motor transmission is not novel. However, because the vasoactive intestinal peptide was initially considered the major transmitter responsible for that output, the formation of the current understanding for the primary significance of NO in the enteric inhibitory motor responses is more recent. Applying NADPH-diaphorase enzyme histochemistry and nNOS immunohistochemistry, we were able to demonstrate numerous nitrenergic somata of myenteric neurons with Dogiel type I morphology. In addition to the observed nitrenergic 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.

ATP is essentially one of the first substances for which early evidence was accumulated that it is a NANC transmitter. ATP is reported to be utilized by inhibitory motor neurons and descending myenteric interneurons. In our study, 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.