

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

**Д-р АНГЕЛ ДИМЧЕВ ДАНДОВ**

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

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**СОФИЯ, 2016**



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ**

**Д-р АНГЕЛ ДИМЧЕВ ДАНДОВ**

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

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен  
«ДОКТОР»**

**Научна специалност: Анатомия, хистология и цитология**

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

**Официални рецензенти:**

**Проф. д-р Димка Вълчанова Хинова-Палова, д.м.**

**Проф. д-р Христо Николов Чучков, д.м.н.**

**СОФИЯ, 2016**

Дисертационният труд е написан на 123 стандартни страници и е онагледен с 38 фигури (29 комбинирани микрофотографии и 9 графики), 2 таблици и 1 схема. В библиографския списък са включени 207 литературни източника, от които 3 на кирилица и 204 на латиница.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински факултет на Медицински университет – София, състояло се на 09.05.2016 год.

Изследванията по дисертационния труд са извършени в Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински факултет на Медицински университет – София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 08.09.2016 год. от 13:00 часа в Анатомична аудитория, Медицински университет – София, бул. „Пенчо Славейков” №34 на открито заседание на научното жури.

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

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> . . . .	2
<b>I. УВОД</b> . . . . .	3
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> . . . . .	5
<b>III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ</b> . . . . .	6
3.1 Експериментални животни и оперативна интервенция . . . . .	6
3.2 Хистологични техники . . . . .	7
3.2.1 Вземане и подготвяне на материала . . . . .	7
3.2.2 Рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин . . . . .	7
3.2.3 Оцветяване по Nissl . . . . .	8
3.2.4 Оцветяване с Neutral red . . . . .	8
3.3 Хистохимични техники. . . . .	8
3.3.1 Никотинамид аденин динуклеотид фосфат дехидрогеназа (диафораза) (NADPH-d). . . . .	9
3.4 Имунохистохимични методи. . . . .	9
<b>IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ</b> . . . . .	11
4.1 Локализация и нормална морфология на мезенцефалното тригеминално ядро. . . . .	11
4.2 Морфологични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия. . . . .	14
4.3 Неврохимични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия . . . . .	29
4.3.1 Пластични промени в експресията на класически невротрансмитери . . . . .	29
4.3.2 Пластични промени в експресията на невроактивни пептиди . . .	34
4.3.3 Пластични промени в експресията на калций-свързващи протеини	38
4.4 Статистически анализ на резултатите. . . . .	41
<b>V. ОБСЪЖДАНЕ</b> . . . . .	52
5.1 Структурна пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони .	52
5.2 Неврохимична пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони	55
<b>VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БЪДЕЩИ НАСОКИ</b> . . . . .	62
<b>VII. ИЗВОДИ</b> . . . . .	63
<b>VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> . . . . .	64
<b>IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> . . . . .	65
<b>X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ</b> . . . . .	66
<b>XI. SUMMARY</b> . . . . .	67
<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b> . . . . .	68

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

# І. УВОД

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

Невроните на ТГ получават аферентна информация основно от механорецептори (за натиск и разтягане), терморецептори (за температурни промени) и ноцицептори (за болкова чувствителност), разположени в областта на лицето, устната и носната кухина (Dubner et al., 1978; Davies, 1988). Също така, със сигурност е установено, че псевдоуниполярните неврони на ТГ получават проприоцептивна информация от дъвкателните мускули, по-конкретно от мускулите, които участват в затварянето и отварянето на долната челюст (Shigenaga et al., 1988b). Техните централни аксони образуват синаптични контакти върху няколко групи неврони от втори порядък, които от своя страна провеждат импулси до соматосензорната кора на мозъка, преминавайки през таламуса (Kruger and Young, 1981; Pfaller and Arvidsson, 1988). Някои от невроните от втори порядък, обаче, образуват локални мрежи в ЦНС и централните им израстъци не достигат до кората (Yoshida et al., 1994, 1998).

Невроните на Me5 инервират главно мускулни вретена в дъвкателните и мускулите на очната ябълка (Alvarado-Mallart et al., 1975; Capra et al., 1985; Shigenaga et al., 1988a), както и други видове рецептори в периодонталните лигаменти (Jerge, 1963; Byers and Holland, 1977; Byers, 1985; Byers et al., 1986;

Shigenaga et al., 1988c; Byers and Dong, 1989; Linden et al., 1994) и зъбната пулпа (Amano et al., 1987; Yoshino et al., 1989).

Първичните тригеминални сетивни (аферентни) неврони споделят общ ембрионален произход, но са с различна съдба по време на развитието си. Различните популации от клетки, които съставят ТГ и Me5, могат да бъдат идентифицирани въз основа на техните морфологични характеристики, невротрансмитерен профил и електрофизиологичните им особености. От морфологична гледна точка се счита, че невроните на Me5 са много подобни или даже еднакви с клетките в черепномозъчните и спиналните ганглии (Johnston, 1909; Freeman, 1925). Също така се смята, че периферните израстъци на невроните на Me5 имат същата скорост на провеждане на нервния импулс като механорецепторните аферентни неврони с нисък праг на възбудимост в ТГ (Byers and Matthews, 1981; Byers and Dong, 1989; Byers, 1985). Досега остава неизяснено, обаче, до каква степен тези неврони се различават по отношение на неврохимичната си характеристика, както и дали те имат еднакъв невротрансмитерен и модулаторен профил. Изясняването на този въпрос е от ключово значение, тъй като невротрансмитерната характеристика и синтез на невроактивни вещества на различните невронални популации често е в пряка взаимовръзка с таргетните им проекции. Предполага се, че тригеминалните първични аферентни неврони проявяват белези на инервационно-специфична неврохимична експресия. Тази концепция е наречена неврохимично кодиране (Costa et al., 1986).

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

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

## II. Ц Е Л И З А Д А Ч И

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

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

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

## III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### 3.1 Експериментални животни и оперативна интервенция

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

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

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

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

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

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

## **3.2 Хистологични техники**

### **3.2.1 Вземане и подготвяне на материала**

За светлинномикроскопските изследвания сме използвали материал от 30 възрастни нормотензивни Wistar плъхове. Експерименталните животните бяха повърхностно упоявани с етер, последвано от интраперитонеално инжектиране на тиопентал (40 mg/kg телесно тегло). След анестезията те бяха перфузирани през възходящата аорта, като канюлата се въвеждаше през лявата камера на сърцето. Първоначално кръвоносната система се промиваше за около 5 минути с 0.05 M фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид (PBS) с рН 7.36. Веднага след промиването се пускаше системата с фиксатора, състоящ се от 4% параформалдехид (Merck) в 0.1 M фосфатен буфер (PB) за около 20 минути. След перфузията отпрепарирахме областта от *pons* и *mesencephalon* в която е локализирано ядрото. Оформените тъканни блокчета се оставяха през нощта за дофиксиране в същия фиксатор на 4°C. След фиксирането материалът се промиваше от остатъчното количество фиксатор до другия ден с чешмяна вода. Включването на материала в парафин налага неговото дехидратиране през възходяща редица от алкохоли, започвайки с поставянето му в 50% етанол за 2 h, след което късчето тъкан се прехвърля в 70% етанол до другия ден, последвано от 80% етанол за 2 h, 96% етанол – 2 пъти по 90 min, 100% етанол – 2 пъти по 60 min. Следващата стъпка включва просветляване на материала в кедрово масло в пеницилинови шишенца. Материалът престоява в кедрово масло, докато придобие кехлибарен цвят или докато потъне на дъното на шишенцето, което може да отнеме няколко дни. След двукратно промиване в ксилол (2 пъти по 20 min), той се включва в парафин. Тази процедура започва с поставяне в първи парафин за 1 h на 56°C в термостат, след което късчето тъкан се поставя във втори парафин за 2 h на 56°C и накрая следва включване на изследваният материал в парафиново блокче.

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

### **3.2.2 Рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин**

Този метод на оцветяване е най-разпространен в хистологичната практика, тъй като благодарение на подходящото съчетание на оцветителите, отнасящи се

към две противоположни групи – основни и кисели бои, е възможно да се добие цялостна представа за микроскопския изглед на изследваната структура.

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

### **3.2.3 Оцветяване по Nissl**

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

### **3.2.4 Оцветяване с неутрално червено (Neutral red)**

При хистологичното оцветяване с Neutral red депарафинираните и доведени до вода срезове се прехвърлят в 96% етанол за 20 min. Следва изплакване в дестилирана вода и последващо оцветяване с 1% воден разтвор на Neutral red за 20 min. След оцветяването следва дехидратиране през възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан.

## **3.3 Хистохимични техники**

Вземането на материала е решаващо за хистохимичното демонстриране на ензимната активност. Най-бързо това става посредством перфузионната или

имерсионна фиксация, но голяма част от ензимите се инактивират при този подход. Друг основен момент при хистохимичното демонстриране на ензимите в Me5 е рязането на материала. В нашите изследвания рязането на материала сме извършили на замразяващ микроскоп Reihert-Jung (Germany) при температура - 22°C, като сме предпочели изготвянето на срезове с дебелина 30 µm.

### **3.3.1 Никотинамид аденин динуклеотид фосфат дехидрогеназа (диафораза) (NADPH-d)**

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

## **3.4 Имунохистохимични методи**

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

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

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

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

**ТАБЛИЦА 1. Списък на първичните антисеруми прилагани при имунохистохимичните реакции**

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

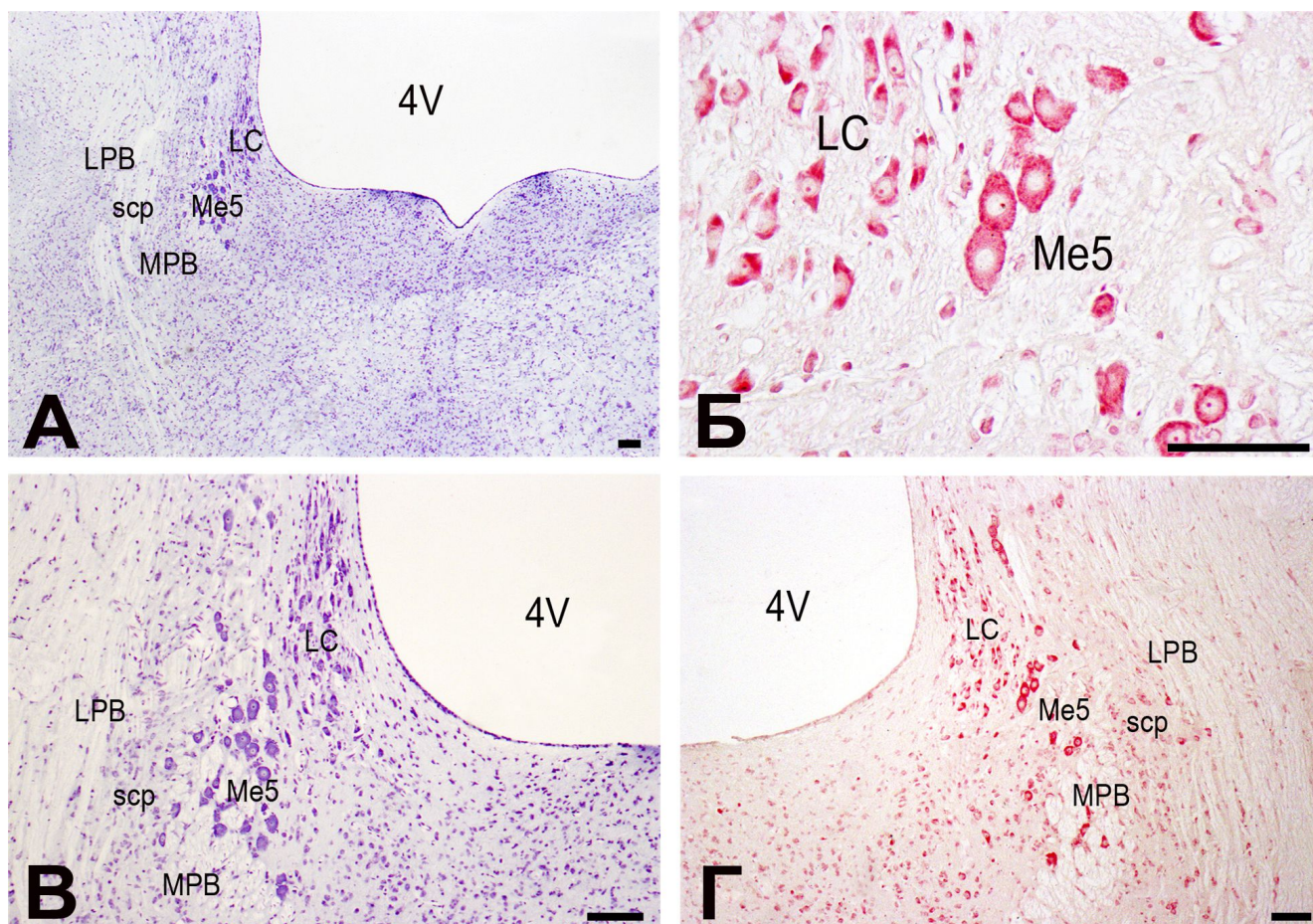
**ТАБЛИЦА 2. Списък на вторичните антители прилагани при имунохистохимичните реакции**

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

## IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Локализация и нормална морфология на мезенцефалното тригеминално ядро

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

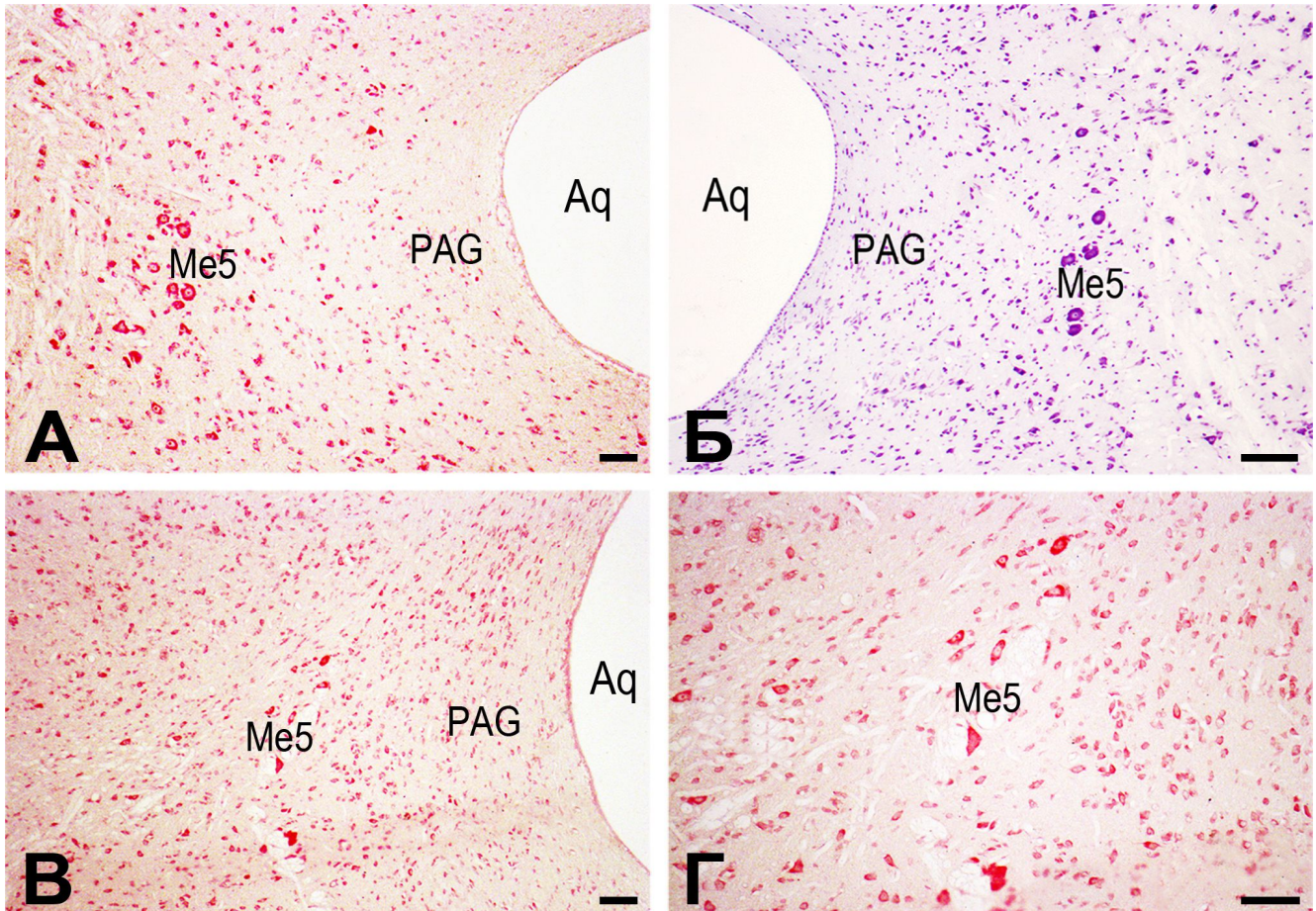


**Фигура 4.1.** Разположение на невроналната популация в каудалната част на Me5 у плъх. (А) Малко увеличение на ядрото на ниво мост, демонстриращо локализацията на Me5 неврони в близост до съседно разположените locus coeruleus (LC) и парабраххиалните ядра. (Б-Г) Срезове на ядрото оцветени с неутрално червено на голямо (Б) и малко увеличение (Г), и с крезил виолет (В), показващи разположението на перикарионите на Me5 неврони в агрегати между LC и медиалното парабраххиално ядро (MPB). LPB, латерално парабраххиално ядро; scp, pedunculus cerebellaris superior, 4V, ventriculus quartus. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

Преобладаващата част (60-80%) от мезенцефалните тригеминални неврони се разполагат в каудалната една трета на ядрото в моста и са концентрирани в групи

от 2-9 клетки в триъгълника между *locus coeruleus* и медиалното парабрахиялно ядро (фиг. 4.1), обхващащи *pedunculus cerebellaris superior* (*brachium conjunctivum*).

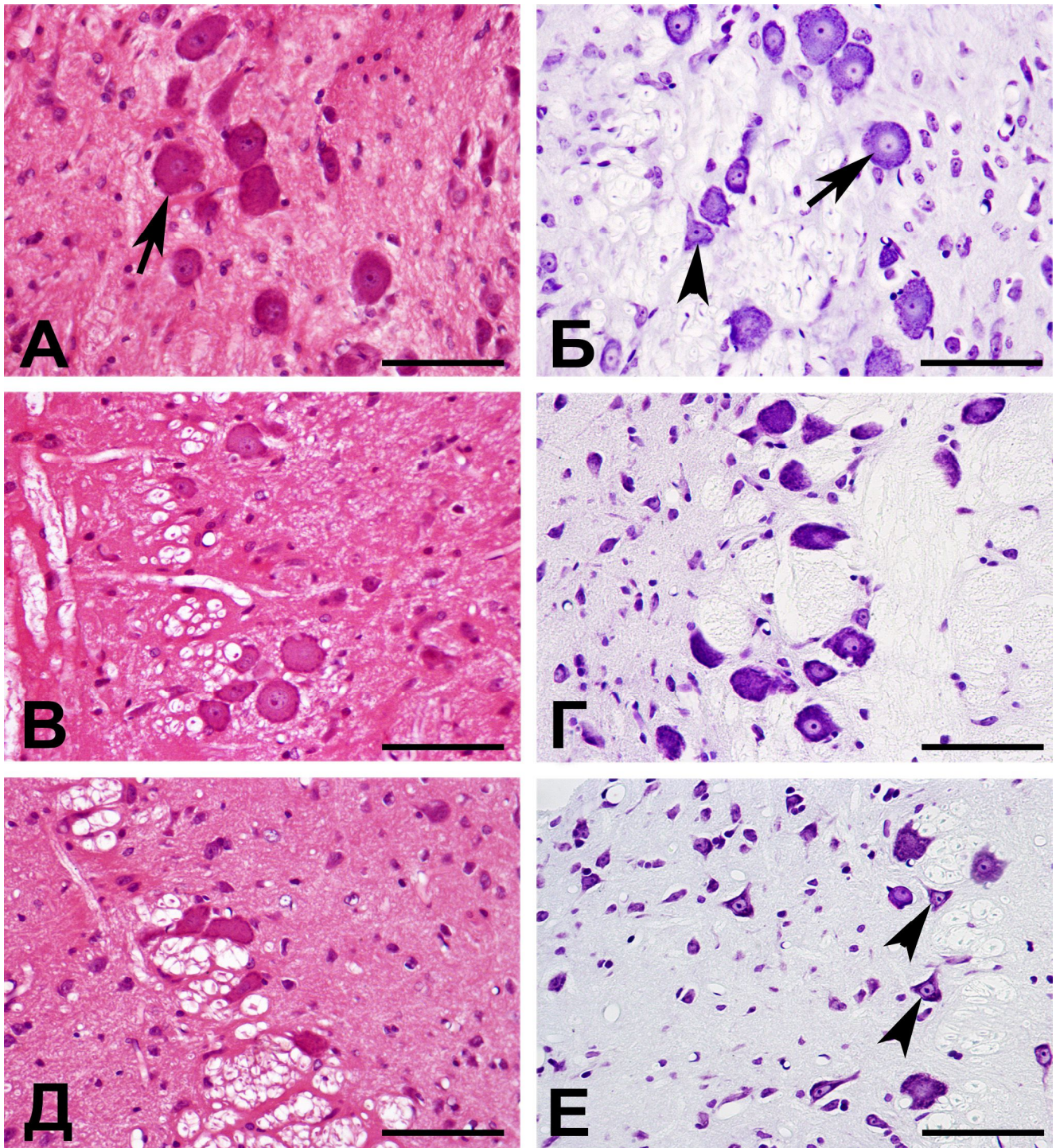
В роstralна посока на ниво среден мозък, разпръснатите мезенцефални тригеминални неврони се наблюдават като тънка, извита маргинална пластинка от перикарионни профили, ограждаща от латерално сивото мозъчно вещество, *substantia grisea centralis* (periaqueductal gray), около *aqueductus cerebri* (фиг. 4.2).



**Фигура 4.2.** Разположение на невроналната популация в роstralната част на Me5 у плъх. (A-B) Малко увеличение на ядрото на ниво среден мозък, показващо локализацията на мезенцефалните тригеминални неврони (Me5) латерално от сивото мозъчно вещество (PAG). (Г) По-голямо увеличение на мезенцефалната част на ядрото, посочено във (B), демонстриращо разпръснати профили на Me5 неврони. Aq, *aqueductus cerebri*. Оцветяване с неутрално червено (A, B и Г) и крезил виолет (B). Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

Мезенцефалното тригеминално ядро у плъх е изградено от две ясно разграничими субпопулации от нервни клетки. Мнозинството от тях са големи, а малка част са малки сферични или овоидни псевдоуниполярни неврони (фиг. 4.3), които се наблюдават по цялата дължина на ядрото, на ниво мост, при преходната

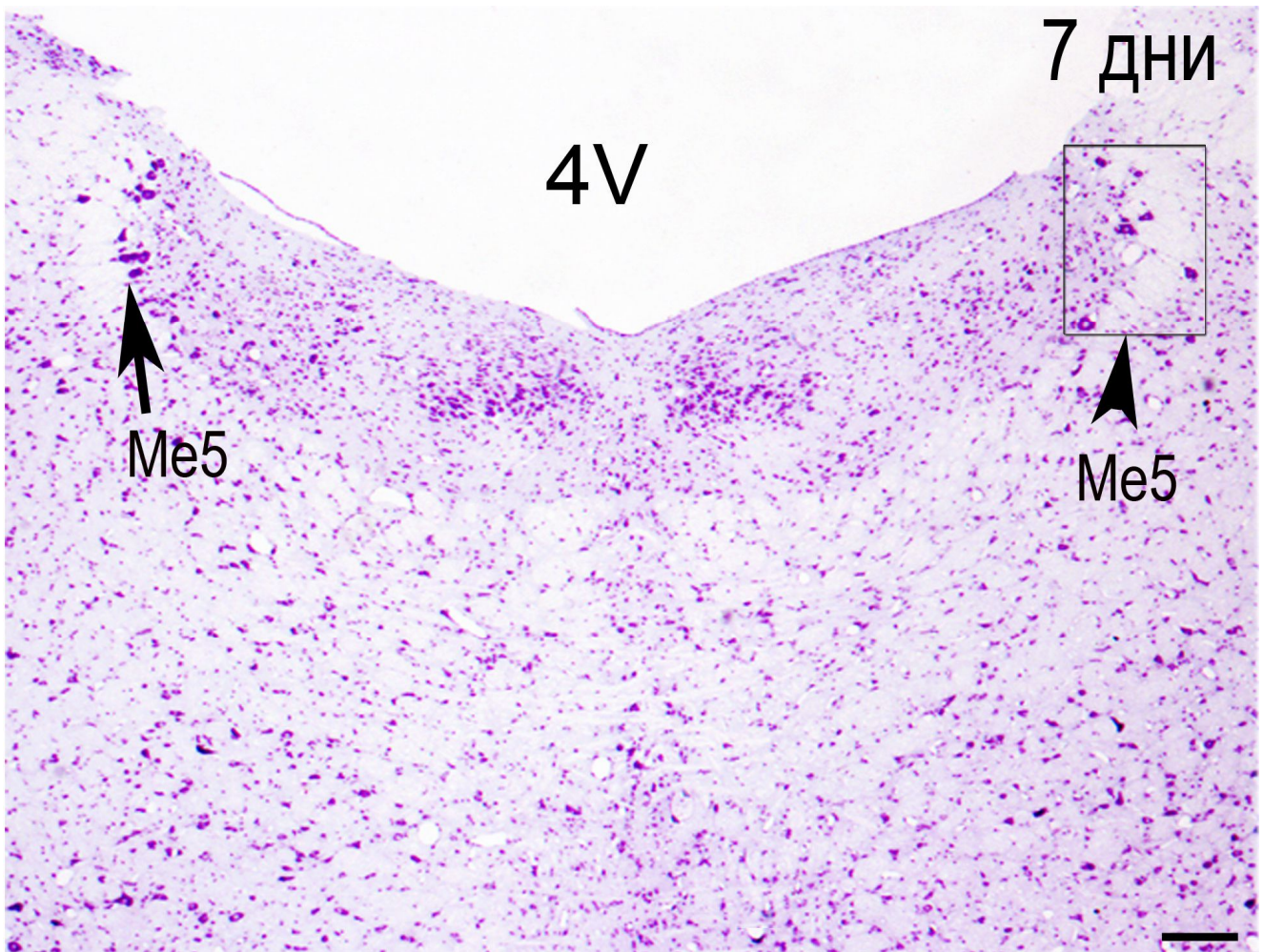
част между мост и среден мозък, и по протежение на последния на нивото на *colliculi caudales (inferiores)* и *colliculi craniales (superiores)*. В допълнение на тях, в каудалната мостова част на ядрото се наблюдават и изолирани малки, вретеновидни мултиполярни неврони (фиг. 4.3).



**Фигура 4.3.** Морфология на невроналната популация на мезенцефалните тригеминални неврони (Me5) у плъх след оцветяване с неутрално червено (А, В и Д) и крезил виолет (Б, Г и Е). Преобладаващата част от Me5 неврони по цялото протежение на ядрото са с големи и сферични клетъчни тела (стрелки), а малка част от тях са малки неврони с мултиполярни перикариони (глави на стрелки). Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

## 4.2 Морфологични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия

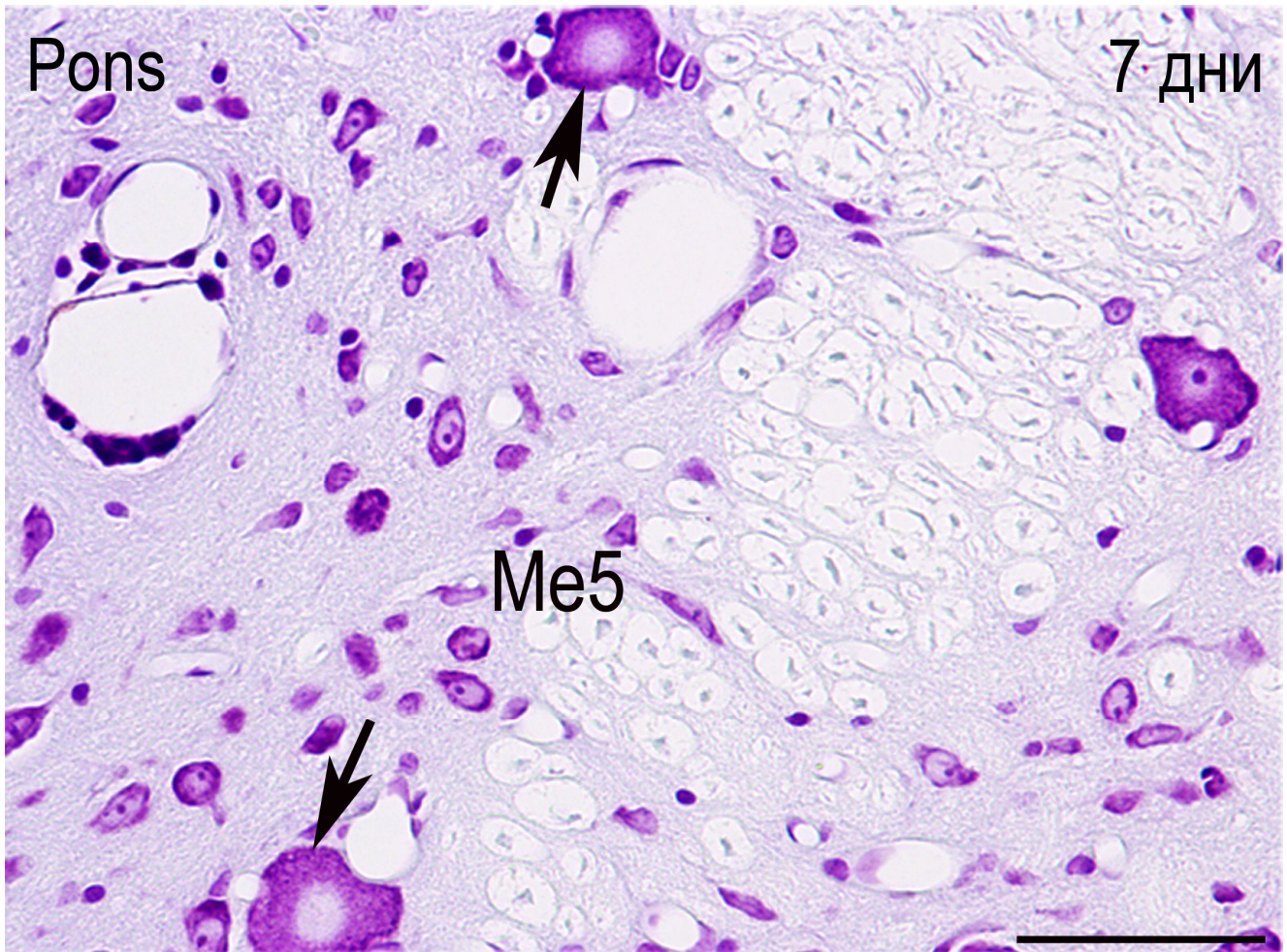
След експериментално едностранно прерязване на *n. massetericus* и период на преживяване от 7 дни, мезенцефалните тригеминални неврони от страната на интервенцията показват незначително намаляване на техния брой, сравнен с този на контралатералните Me5 неврони от интактната мозъчна половина (фиг. 4.4). Подобна находка се регистрира по цялото протежение на ядрото, на ниво мост и среден мозък.



**Фигура 4.4.** Микрофотография през мостовата част на Me5 у плъх 7 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus*. Мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) числено са намалени незначително в сравнение с броя им на интактната мозъчна половина (стрелка). 4V, *ventriculus quartus*. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

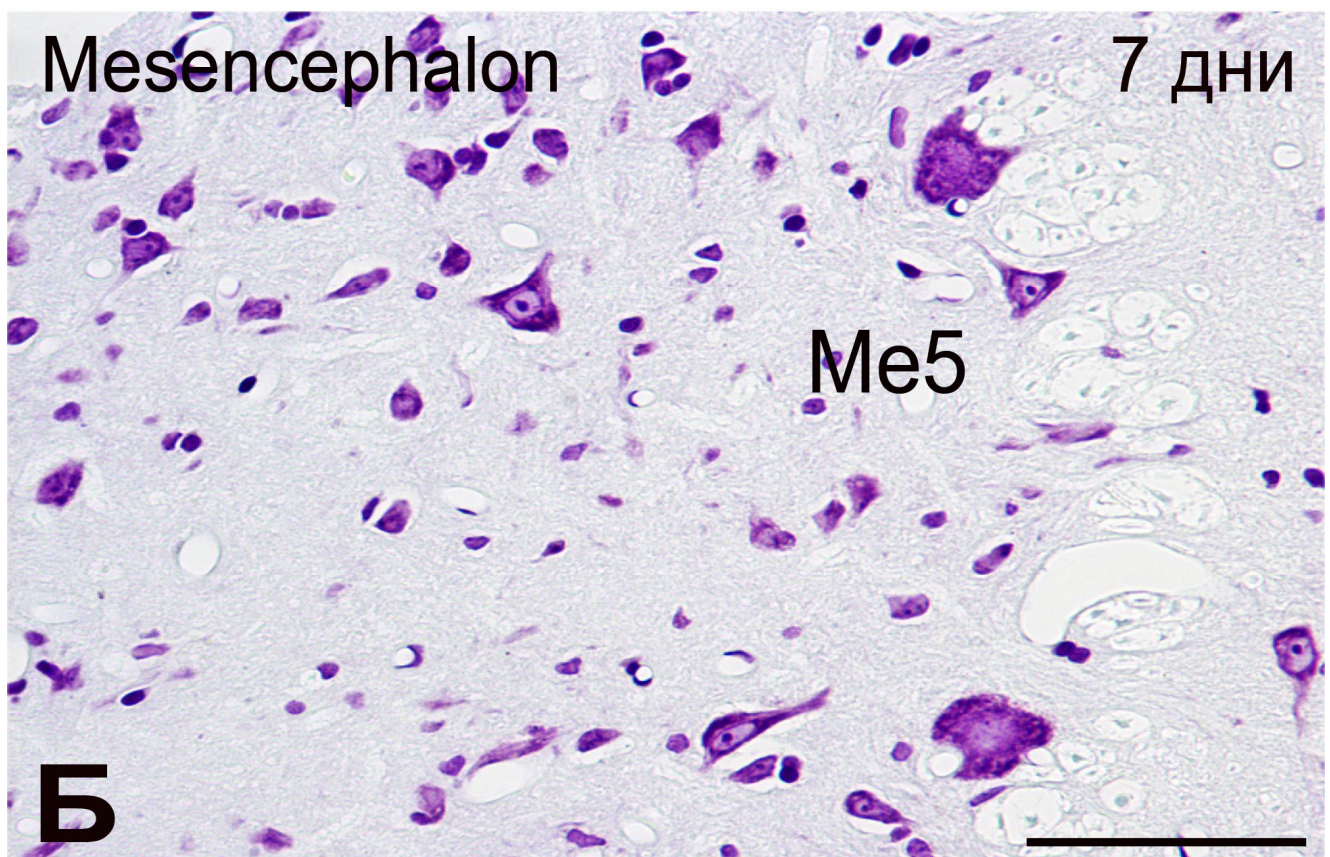
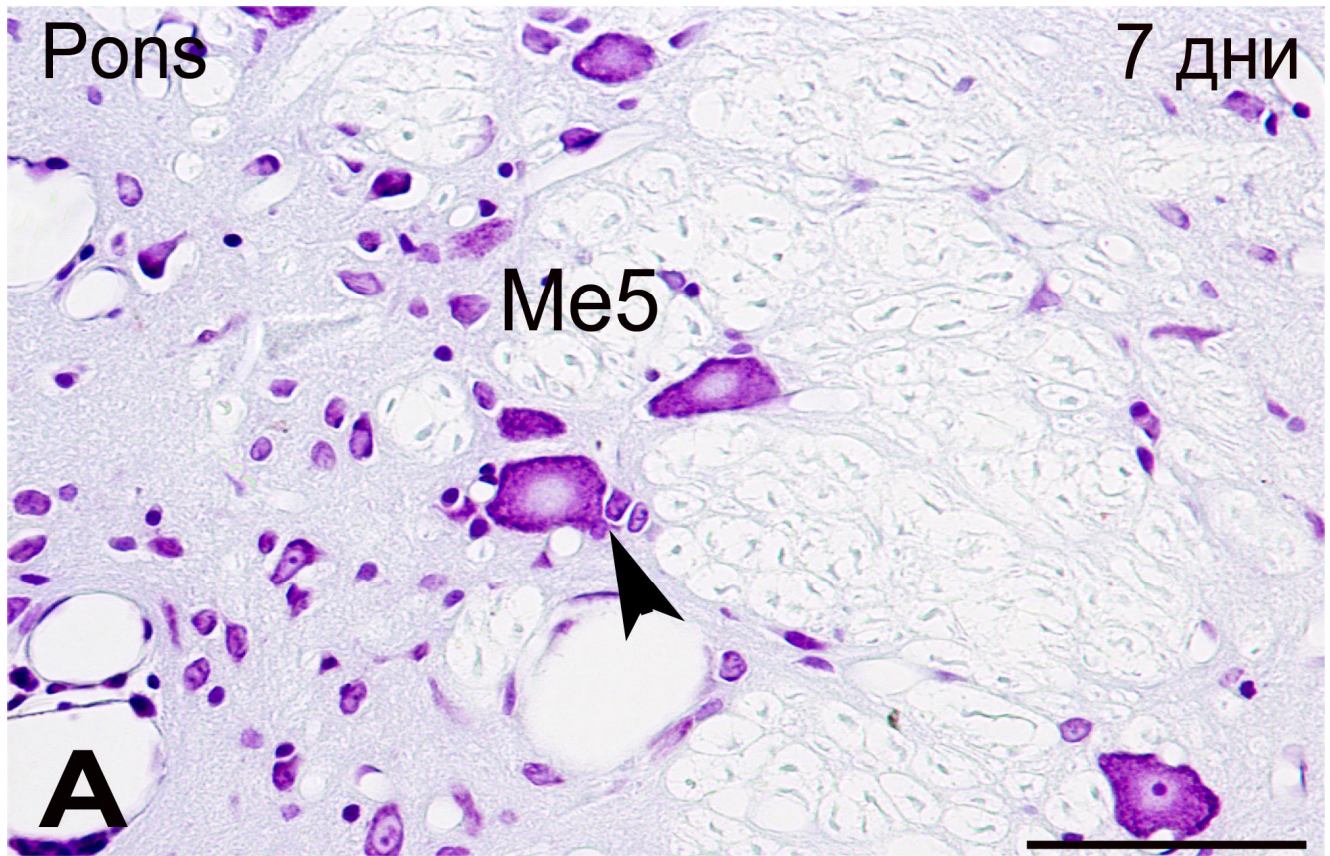
В това време, на по-голямо увеличение на микроскопа се установяват първите морфологични прояви на хроматолиза в перикарионите на аксотомираните Me5 неврони. Хроматолитичните промени в ядрото са по-силно изразени в големите

мезенцефални тригеминални неврони, в сравнение с проявите в по-малките псевдоуниполярни и мултиполярните Me5 неврони. Те засягат както клетъчното ядро, така и цитоплазмата и се изразяват в избледняване, а в някои неврони и пълно изчезване на базофилно оцветените Нислови грануляции в перикариона. Ядрата на увредените неврони се уголемяват и се изместват периферно, а кондензираният хроматин дезинтегрира и се деспирализира (фиг. 4.5).



**Фигура 4.5.** По-голямо увеличение на очертаната зона в предишната микрофотография, демонстриращо хроматолитичните промени в големите аксомирани мезенцефални тригеминални невронални профили (стрелки). Седем дни след интервенцията се наблюдава начална дезинтеграция на Нисловата субстанция и хетерохроматина в ядрото. Оцветяване по Нисл с крезил виолет.

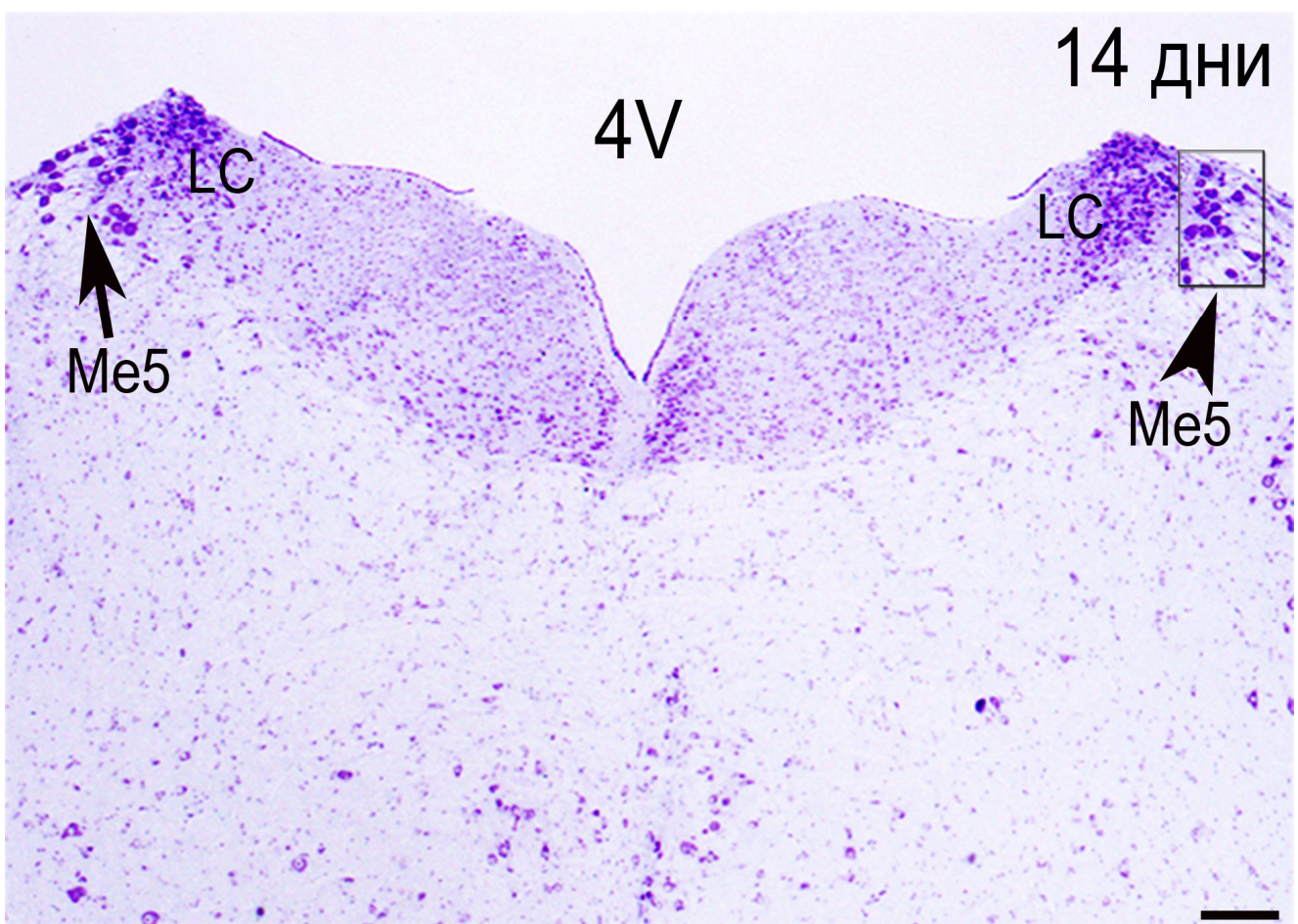
Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



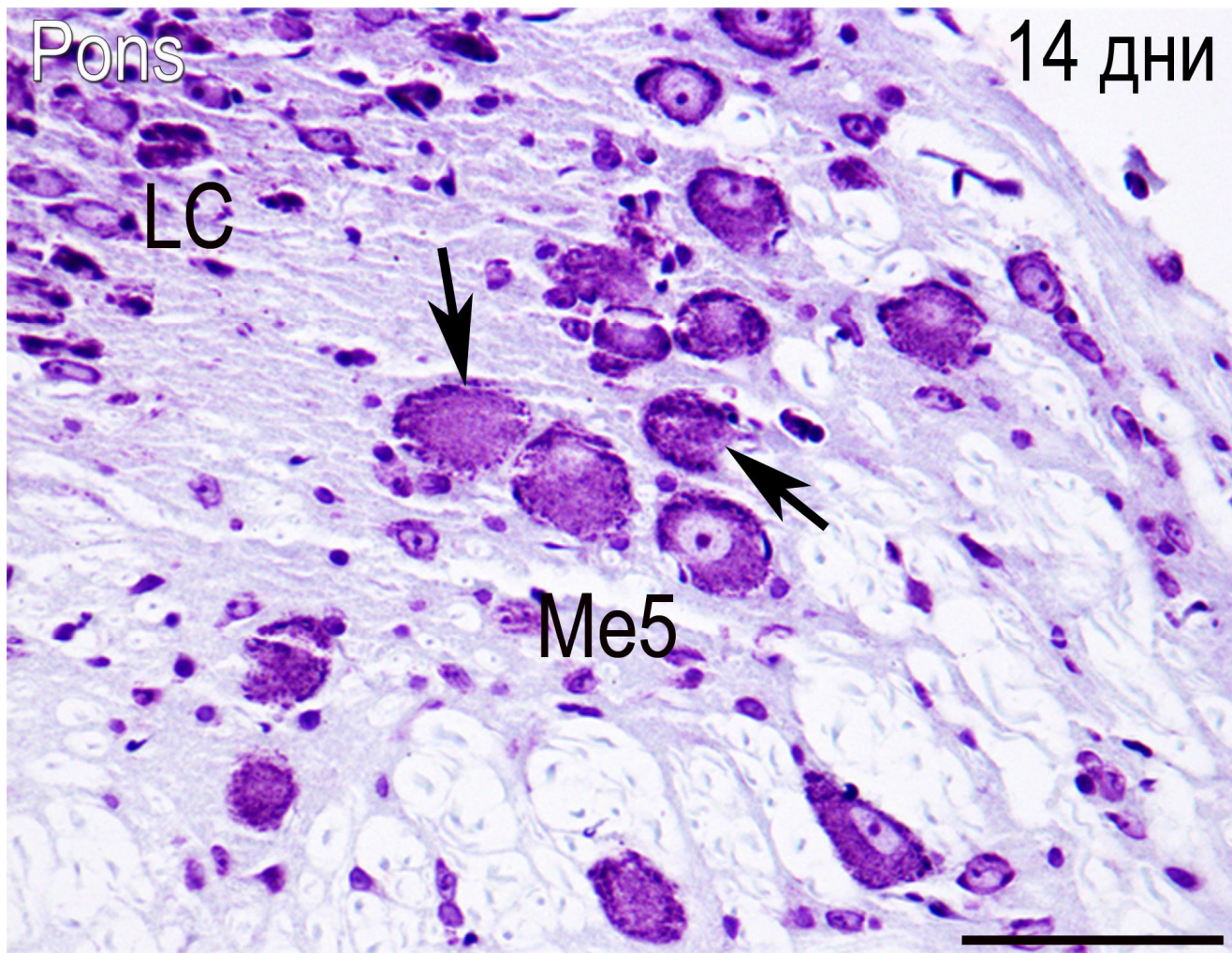
**Фигура 4.6.** Начална Валерова дегенерация в аксона (глава на стрелка) на аксотомиран мезенцефален тригеминален неврон в мостовата (А) и мезенцефална (Б) част на Me5 7 дни след периферна аксотомия. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

Дегенеративни промени се наблюдават и в аксоналните израстъци дистално от мястото на прерязване на нерва. Те протичат по типа на т.нар. дегенерация на Waller и се манифестират с дезинтеграция на аксоналния скелет, нарушения в цялостта на аксолемата, а впоследствие и на миелиновата обвивка (фиг. 4.6).

Две седмици след аксотомията броят на засегнатите Me5 неврони от страната на нервното прерязване продължава да намалява в сравнение с ипсилатералната контролна страна (фиг. 4.7). По това време, наред с персистиращите и описани по-горе морфологични клетъчни промени, в перикарионите на увредените мезенцефални тригеминални неврони могат да бъдат наблюдавани базофилни грануляции и дегенеративни профили (фиг. 4.8).

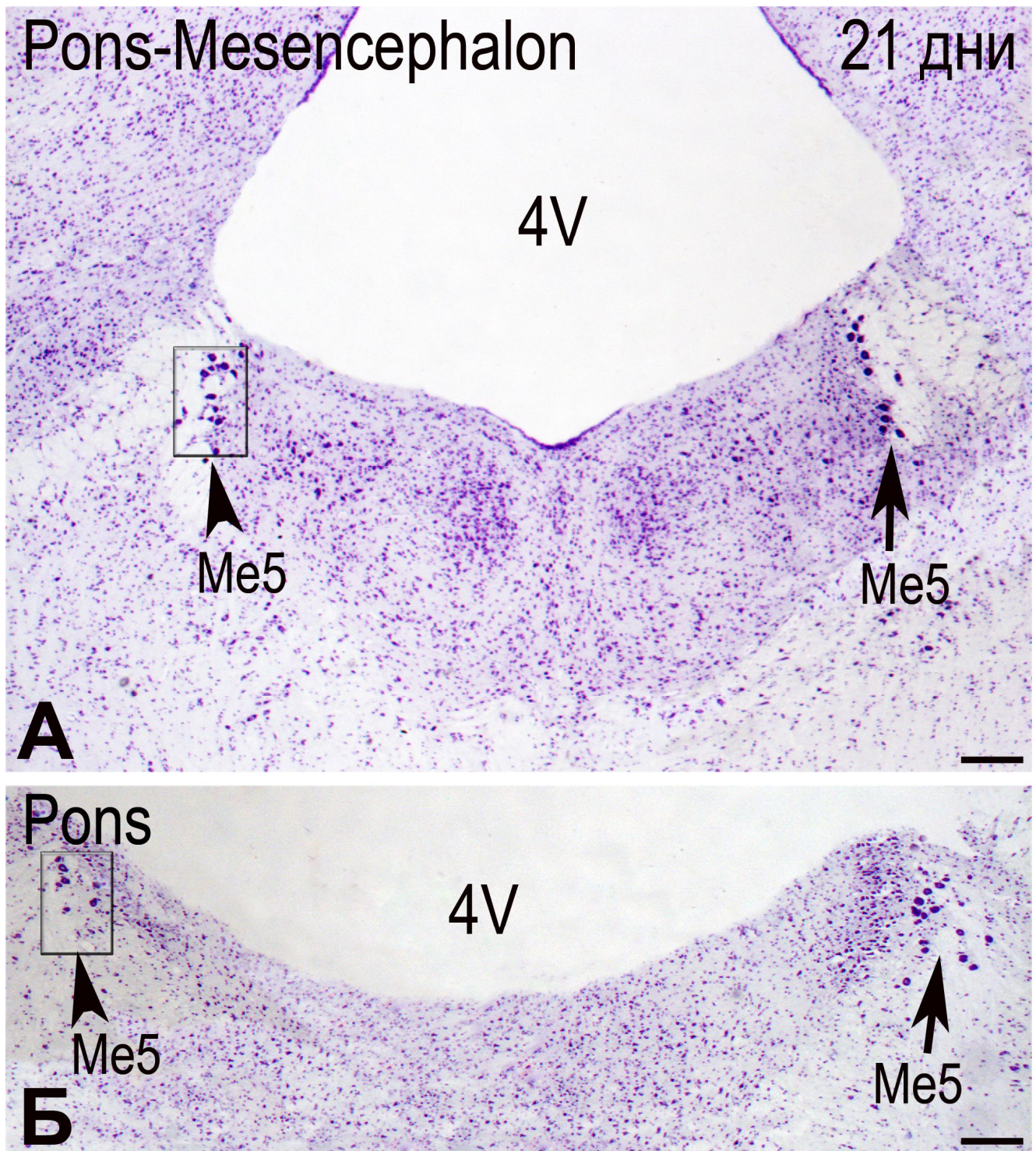


**Фигура 4.7.** Микрофотография от каудалната част на Me5 у плъх 14 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus*. Броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) е редуциран в сравнение с броя им на интактната (стрелка) мозъчна половина. LC, locus coeruleus; 4V, ventriculus quartus. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

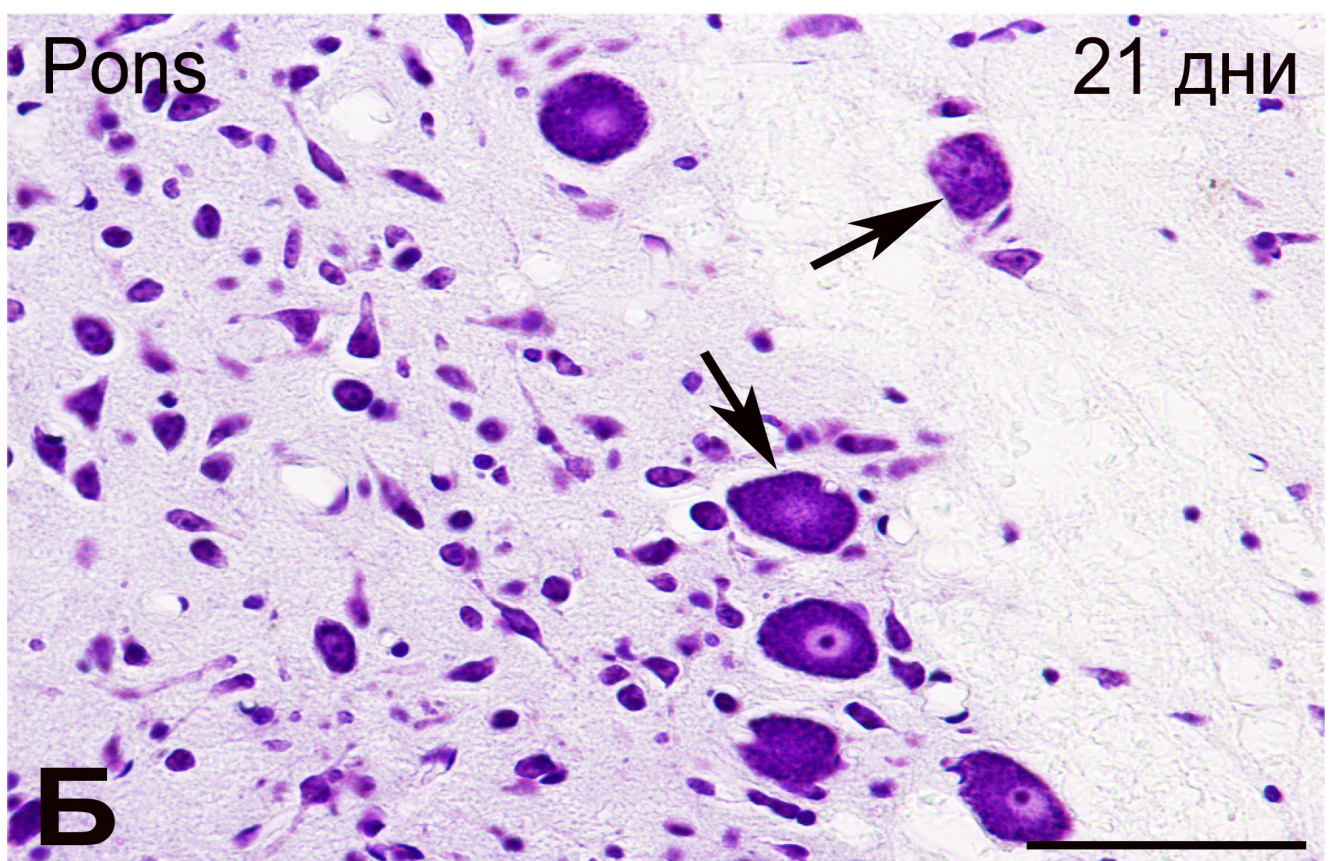
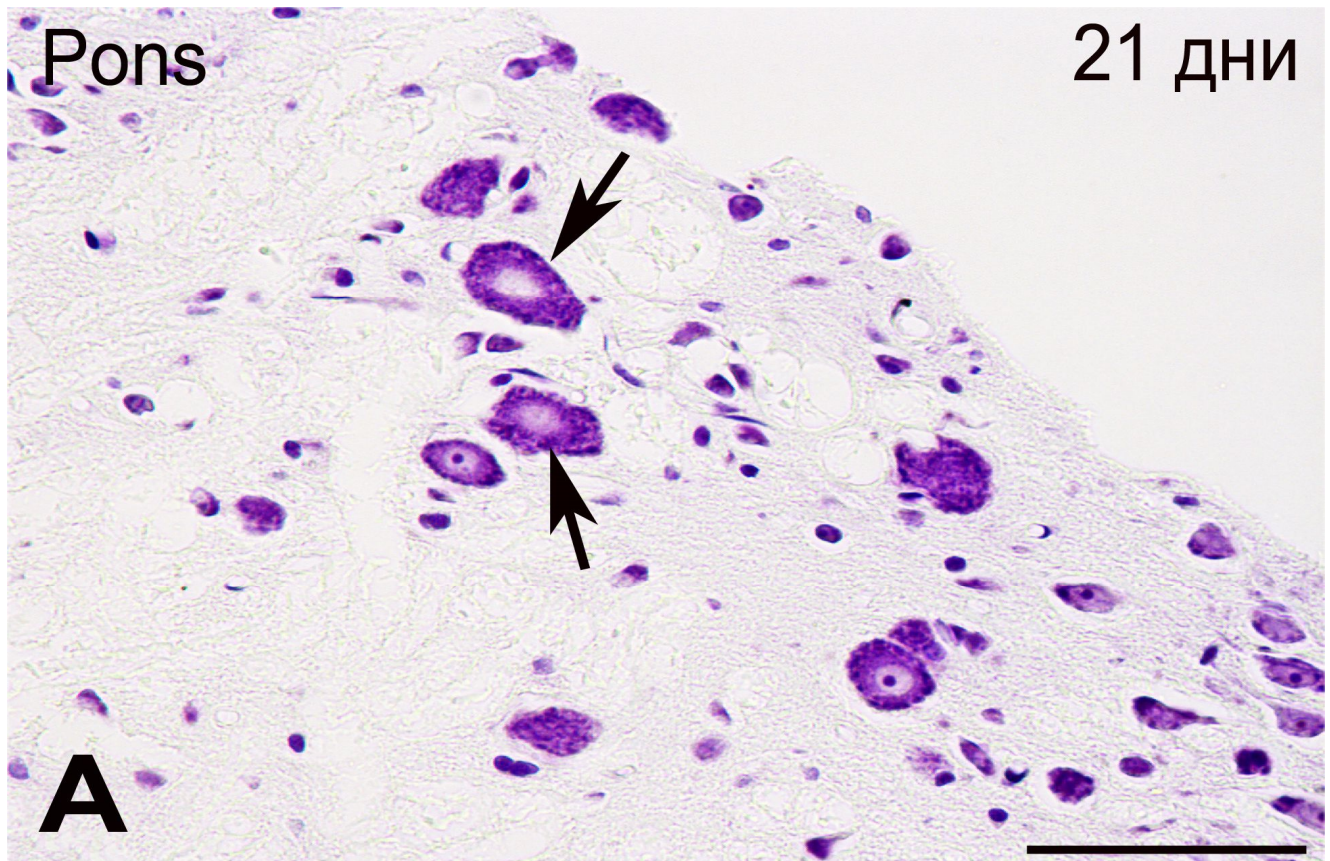


**Фигура 4.8.** По-голямо увеличение на очертания правоъгълник от предходната микрофотография, демонстриращо хроматолитичните промени на този етап в аксотомираните Me5 неврони. Обърнете внимание на наличието на базофилни грануляции в дегенериралите невронални профили (стрелки). LC, locus coeruleus. Оцветяване с крезл виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

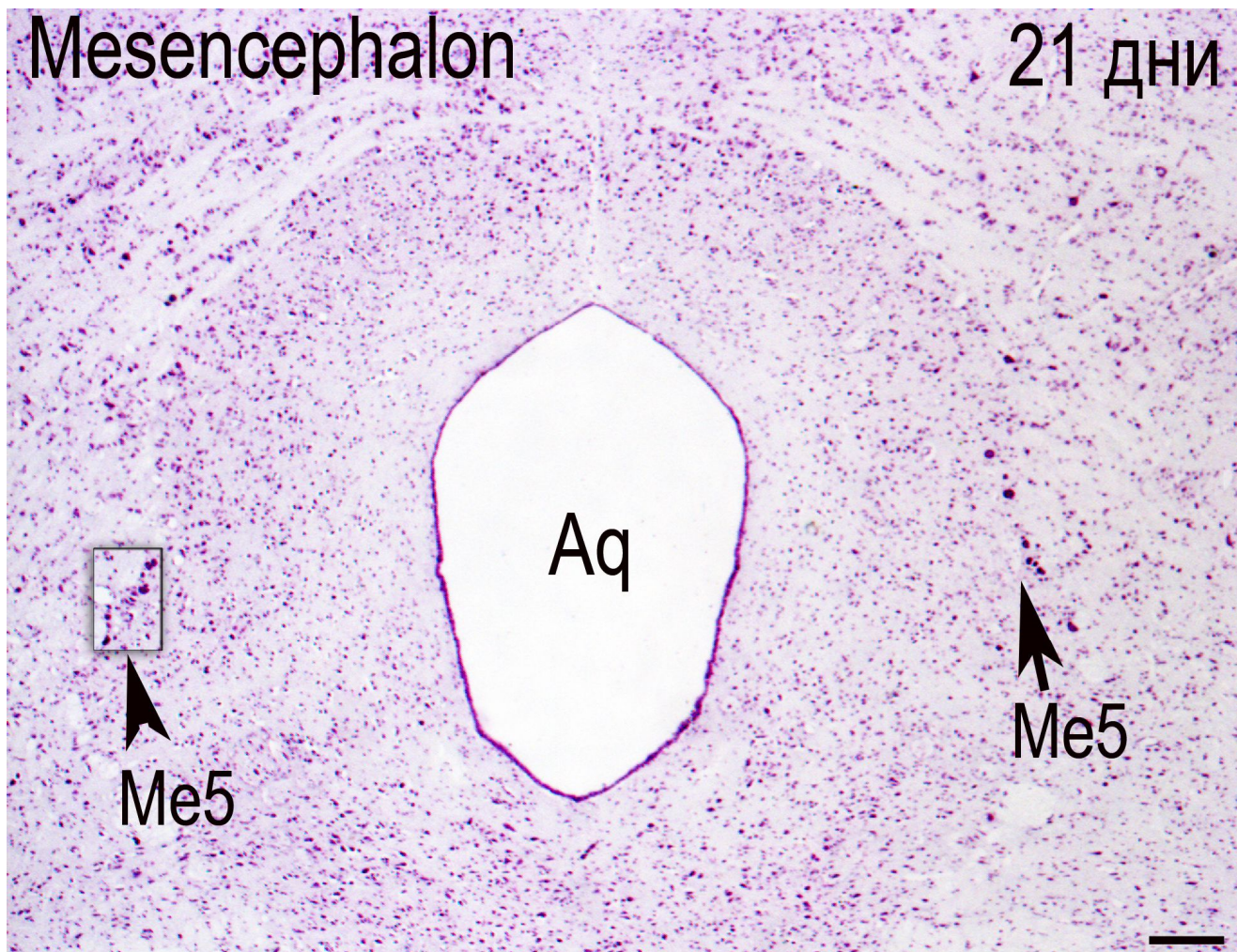
След период на преживяване 21 дни, редуцираните по брой Me5 неврони на ниво мост от страната на аксоналната увреда са ясно забележими – броят на аксотомираните неврони е значително по-малък, в сравнение с този на интактните неврони на контролната страна (фиг. 4.9). Техните клетъчни тела, независимо от размера и формата им, показват всички белези на невронална дегенерация (фиг. 4.10). Подобна картина се установява и на по-рострално ниво на ядрото в средния мозък – броят на аксотомираните Me5 неврони е видимо по-малък, сравнен с броя на интактните такива (фиг. 4.11). Увредените мезенцефални тригеминални неврони показват белезите на трансневронална дегенерация с поява на хроматолитични гранули и диспергиране на ядрения хроматин (фиг. 4.12).



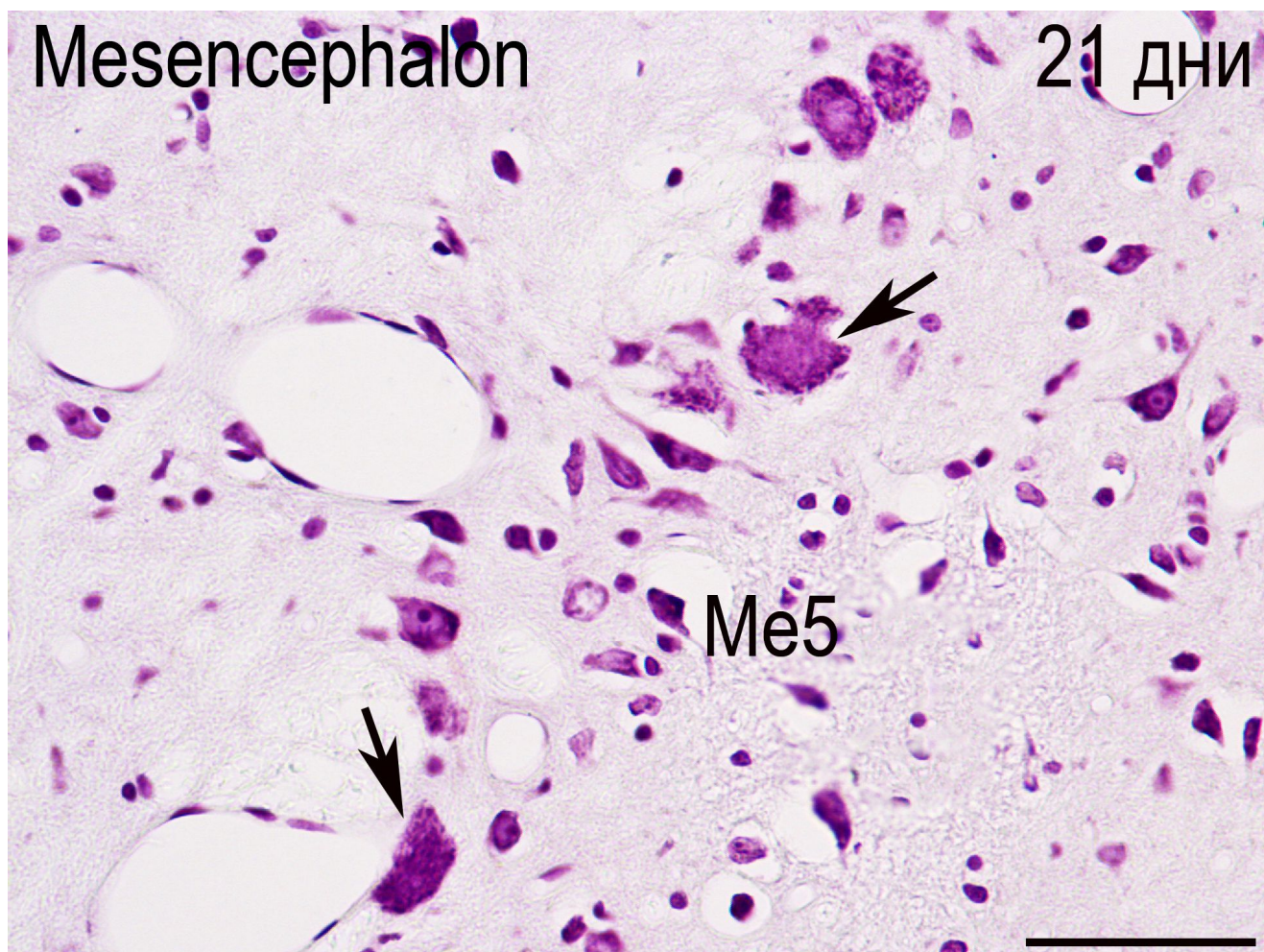
**Фигура 4.9.** (А, Б) Микрофотографии от преходната мост-среден мозък (А) и мостова (Б) части на Me5 у плъх 21 дни след едностранна аксотомия на *p. massetericus*. Броят на аксотомираните Me5 неврони (глави на стрелка) е видимо намален в сравнение с този на интактните неврони (стрелки). 4V, *ventriculus quartus*. Оцветяване с кризил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.



**Фигура 4.10.** (А) По-голямо увеличение на очертания правоъгълник от фиг. 5.10А, и друга зона от мостовата част на Me5 у плъх (Б), показващи дегенерирани Me5 неврони (стрелки) 21 дни след едностранна аксотомия. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

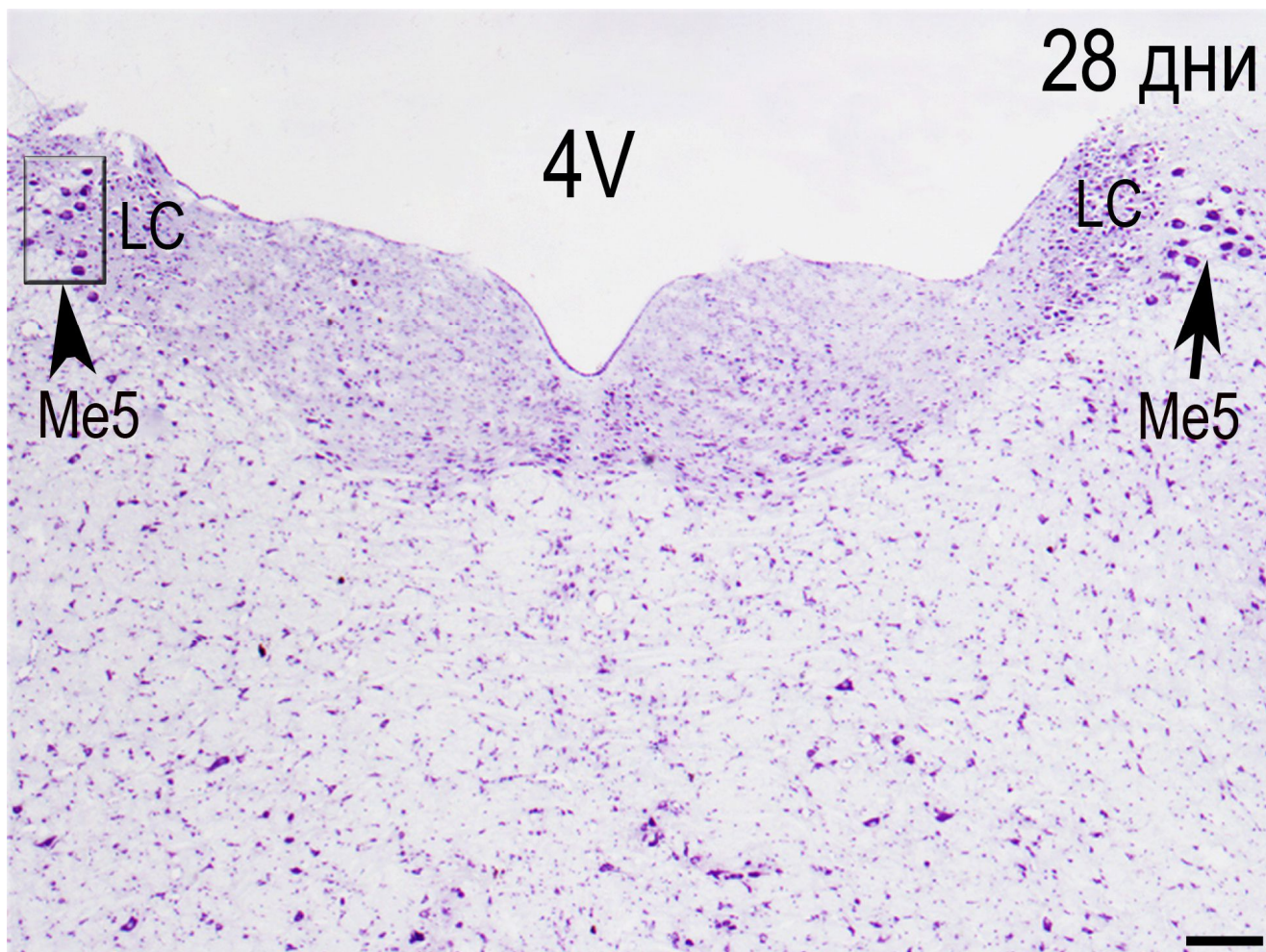


**Фигура 4.11.** Микрофотография от средномозъчната част на Me5 у плъх 21 дни след едностранна аксотомия на *p. massetericus*. Ясно се забелязва редуцирания брой на аксомираните Me5 неврони (глави на стрелка) в сравнение с този на невроните от интактната мозъчна страна (стрелки). Aq, *aqueductus cerebri*. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

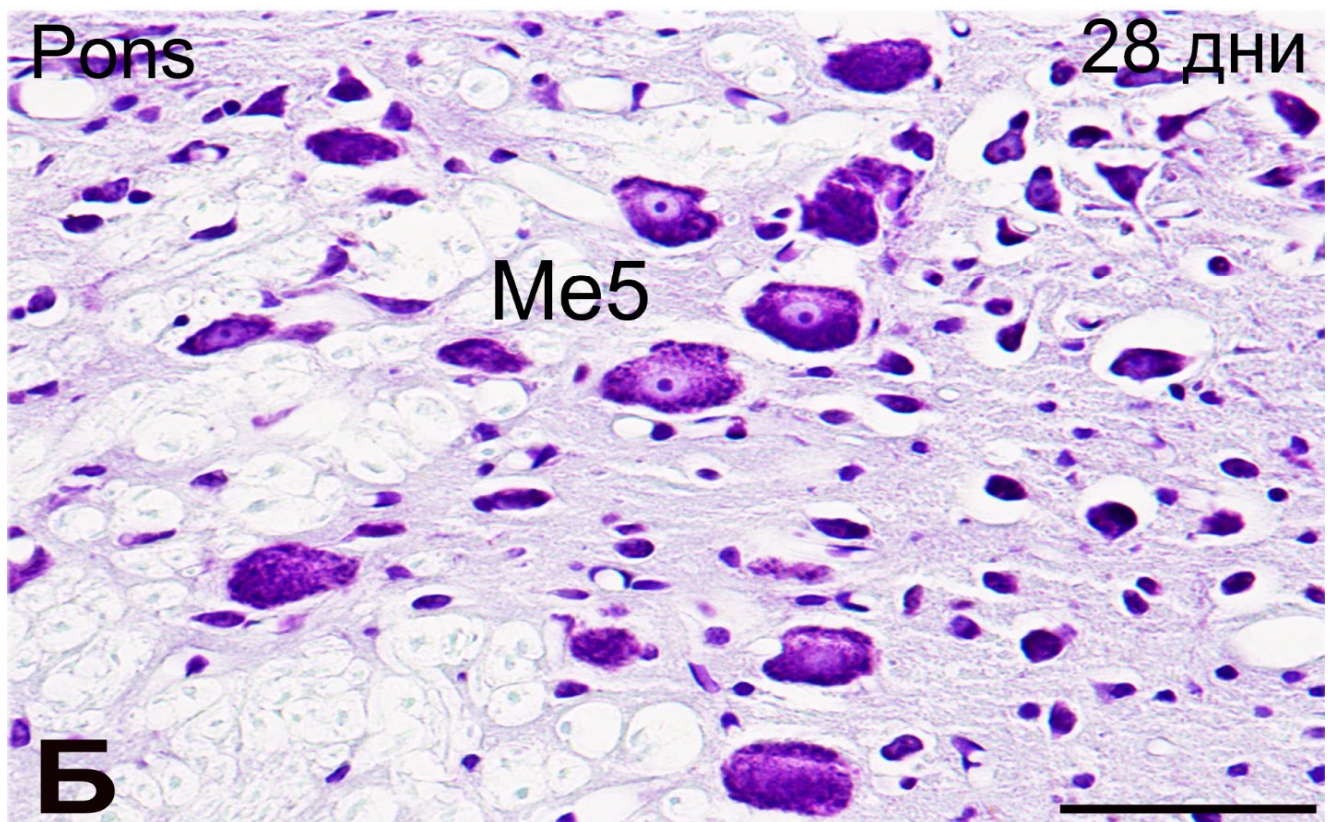
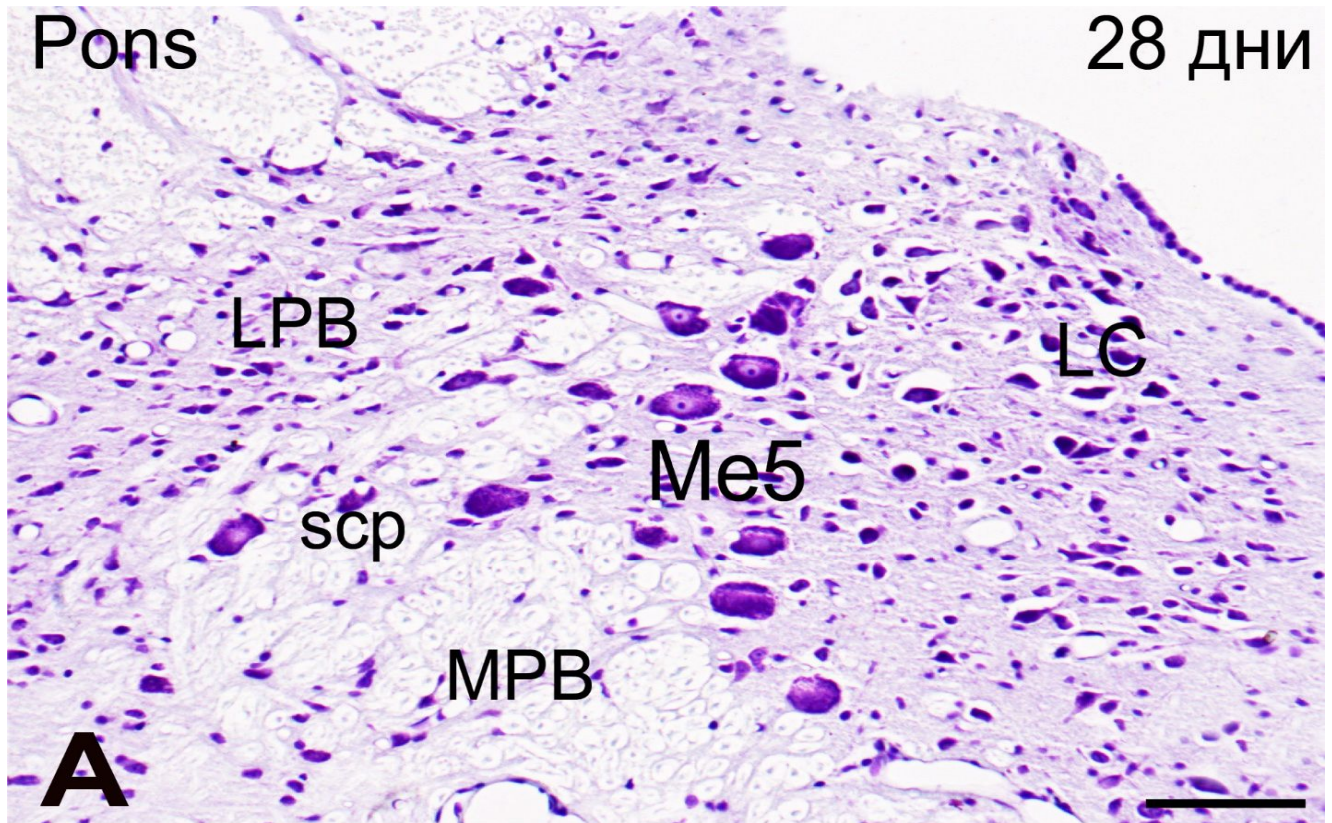


**Фигура 4.12** По-голямото увеличение на очертания правоъгълник от предходната фигура ясно демонстрира увредени Me5 неврони (стрелки) с белези на трансневронална дегенерация 21 дни след едностранна аксотомия. Оцветяване с кризил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

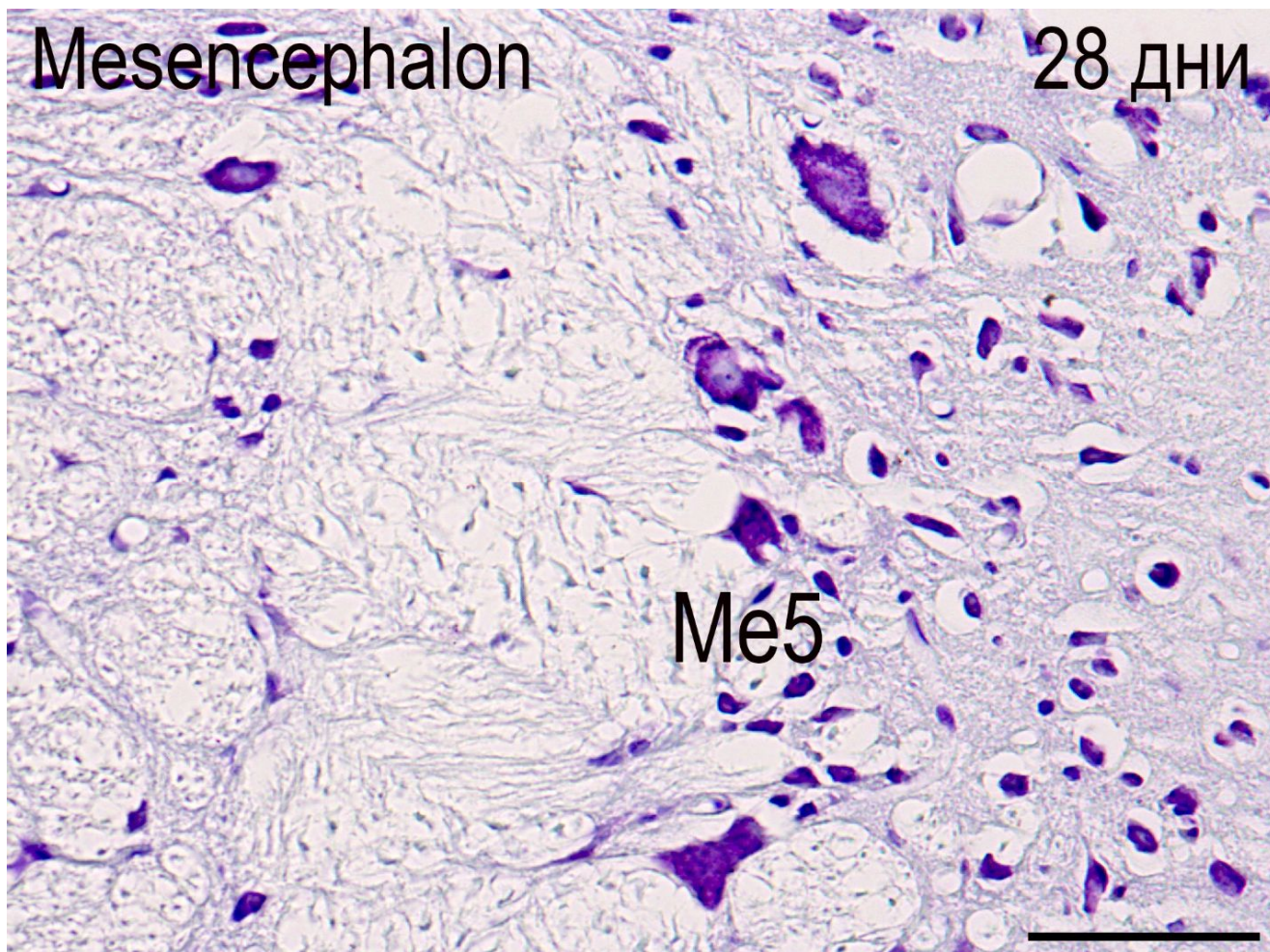
На 28-ия ден след оперативната интервенция, на аксотомираната страна на ядрото на ниво мост все още може да бъде регистриран значителен спад в броя на мезенцефалните тригеминални неврони, който е по-голям от наблюдавания брой увредени неврони на 7-ия постоперативен ден и от този, наблюдаван на нетретираната контролна мозъчна половина (фиг. 4.13). В същото време, нивото на невронална дегенерация е леко понижено (фиг. 4.14), но описаната находка е налице все още в последващите дни след интервенцията. Описаните морфологични промени не показват забележими субективни различия между невроните, разположени в каудалната и роstralната част (фиг. 4.15) на ядрото.



**Фигура 4.13.** Микрофотография на малко увеличение от каудалната част на Me5 у плъх 28 дни след едностранно прерязване на *p. massetericus*. Броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) е по-малък от този на невроните от интактната мозъчна половина (стрелка). LC, locus coeruleus; 4V, ventriculus quartus. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

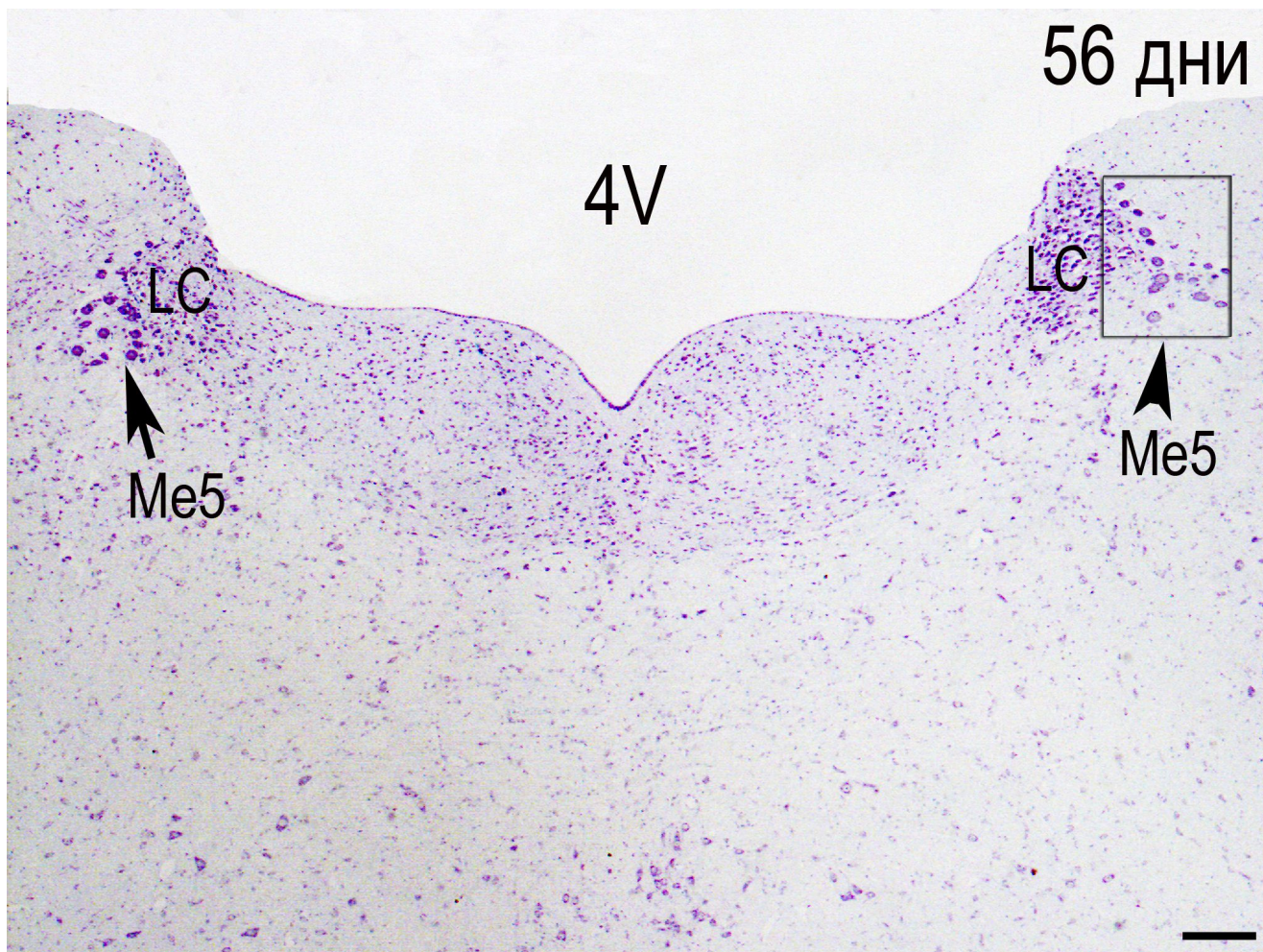


**Фигура 4.14.** (А, Б) По-големи увеличения на очертаната зона в предишната микрофотография, демонстриращи хроматолитичните промени в големите аксотомирани мезенцефални тригеминални невронални профили (Me5). LC, locus coeruleus; MPB, медиално парабрахиялно ядро; LPB, латерално парабрахиялно ядро; scr, pedunculus cerebellaris superior. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



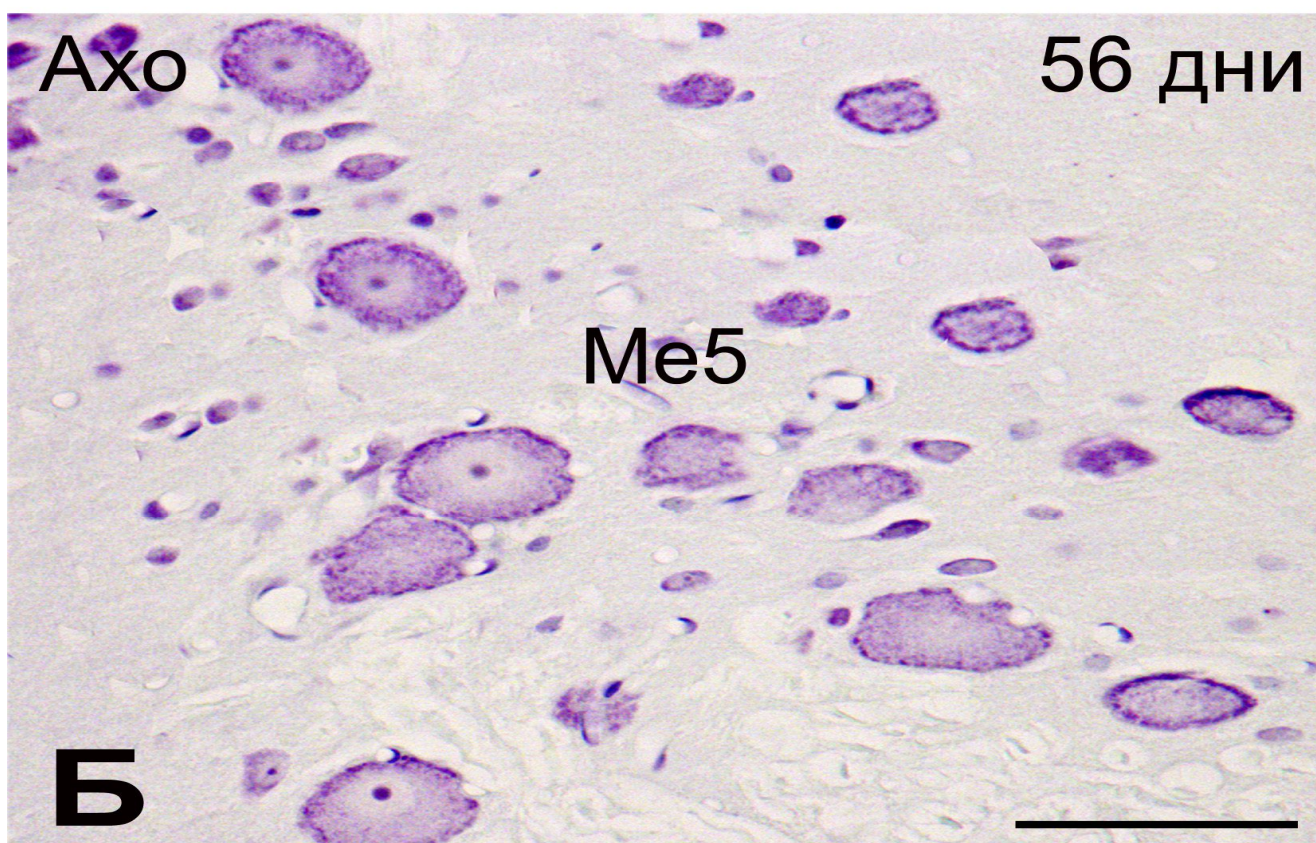
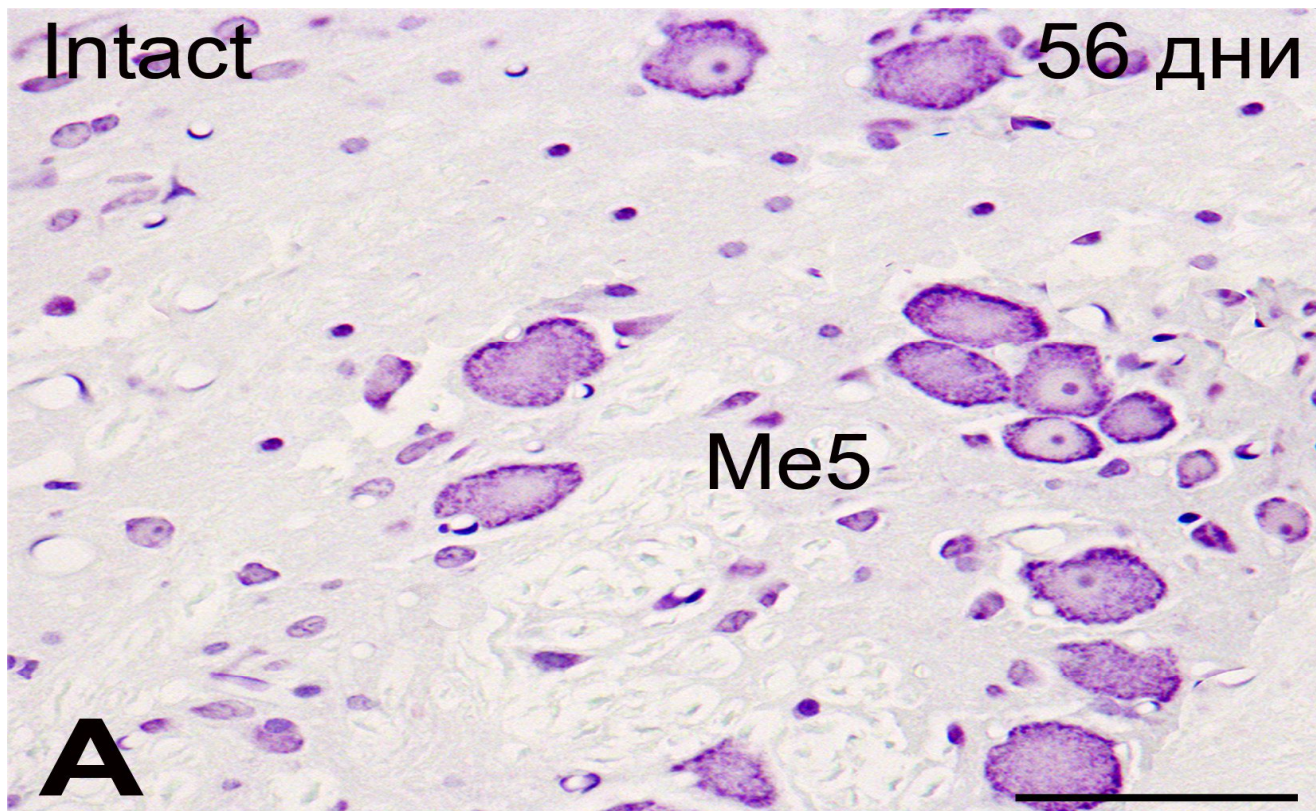
**Фигура 4.15** Подобна находка се установява в каудалната средномозъчна част на Me5 у плъх 28 дни след едностранна аксотомия на *p. massetericus*. Ясно се забелязват дегенерирани профили на разпръснати аксотомирани Me5 неврони. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

След период на преживяване след оперативното вмешателство от 56 дни, броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията все още е по-малък, макар че вече е трудно да се забележат значими и отчетливи различия в сравнение с картината на интактната страна (фиг. 4.16). Освен това, не се установяват и визуално забележими промени в морфологията на Me5 неврони от ипсилатералната и контралатералната мозъчна страна (фиг. 4.17А, Б).

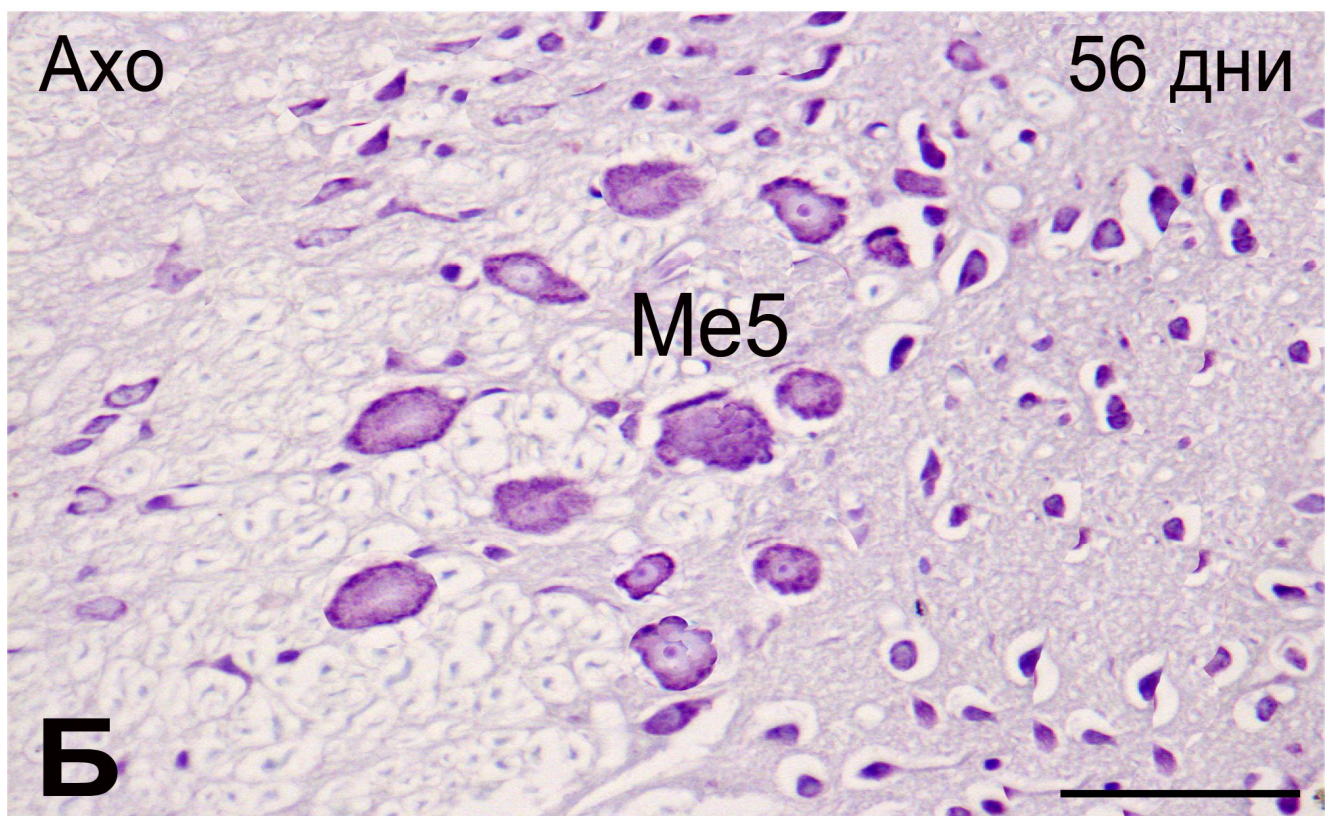
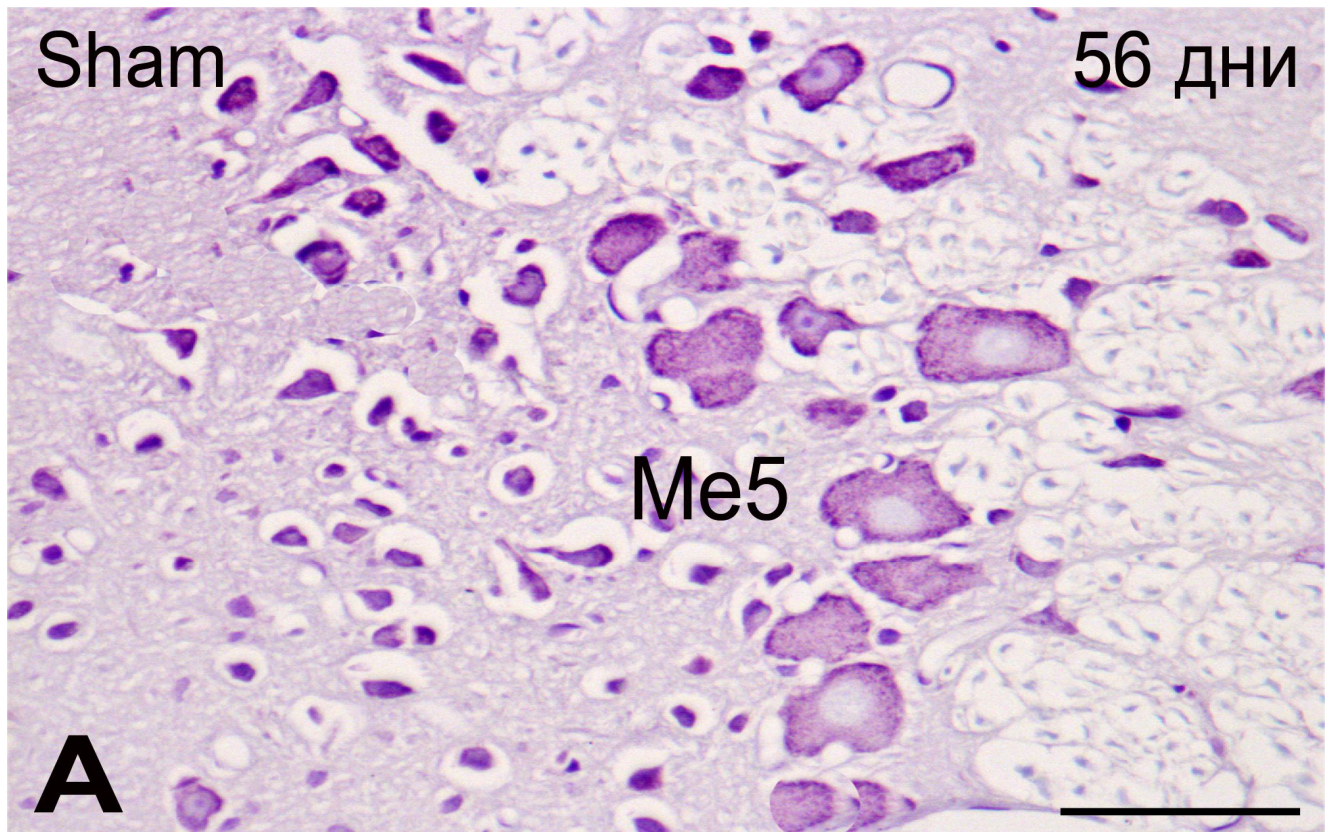


**Фигура 5.16.** Микрофотография през мостовата част на Me5 у плъх 56 дни след едностранно прерязване на *p. massetericus*. Броят на мезенцефалните тригеминални неврони на страната на аксотомията (глава на стрелка) е все още видимо по-малък от този на невроните в интактната мозъчна половина (стрелка). LC, locus coeruleus; 4V, ventriculus quartus. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

Подобна констатация за документираните хронологично промени в броя и морфологията на мезенцефалните тригеминални неврони може да се направи и при сравнение на аксотомираните Me5 неврони със срещуположните неврони в ядрото от контролната страна, на която е проведена само лъжлива оперативна интервенция с разрязване и последващо зашиване на кожата без прекъсване на периферния нерв (фиг. 4.18А, Б).



*Фигура 4.17. По-голямото увеличение на интактната (А) и очертаната в правоъгълник аксотомирана страна (Б) на Me5 от предходната фигура 56 дни след едностранна аксотомия. Броят и морфологията на мезенцефалните тригеминални неврони от двете страни са приблизително еднакви. Оцветяване с крезил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.*

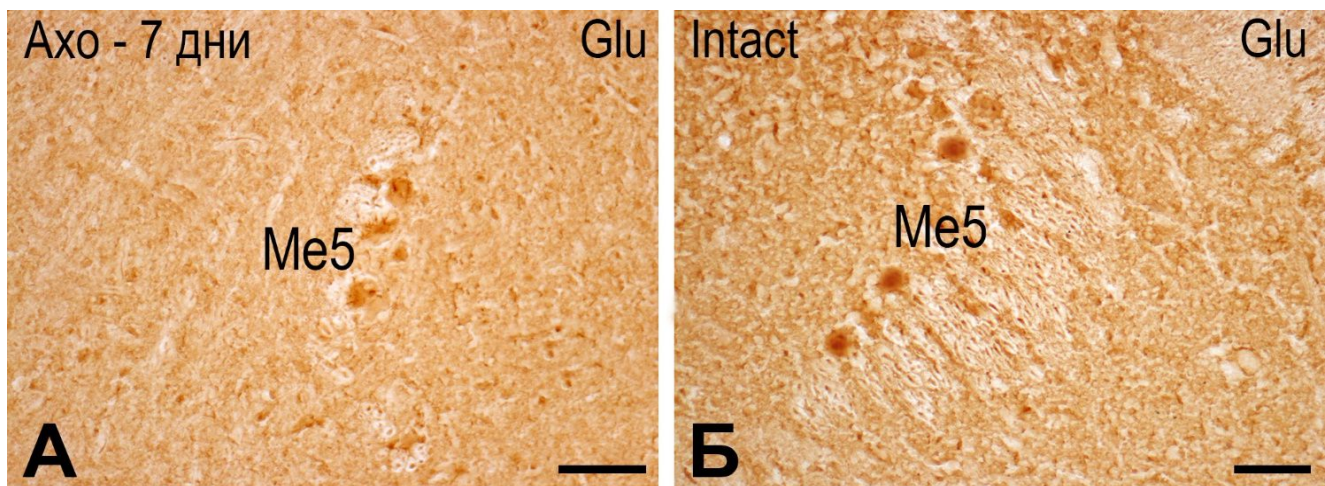


**Фигура 4.18.** Сходна е хистологичната находка на мезенцефалните тригеминални неврони (Me5) на страната на лъжливооперираната (А) и аксотомизирана (Б) мозъчна половина 56 дни след оперативната интервенция. Броят и морфологията на мезенцефалните тригеминални неврони от двете страни са приблизително еднакви. Оцветяване с кризил виолет по Нисл. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

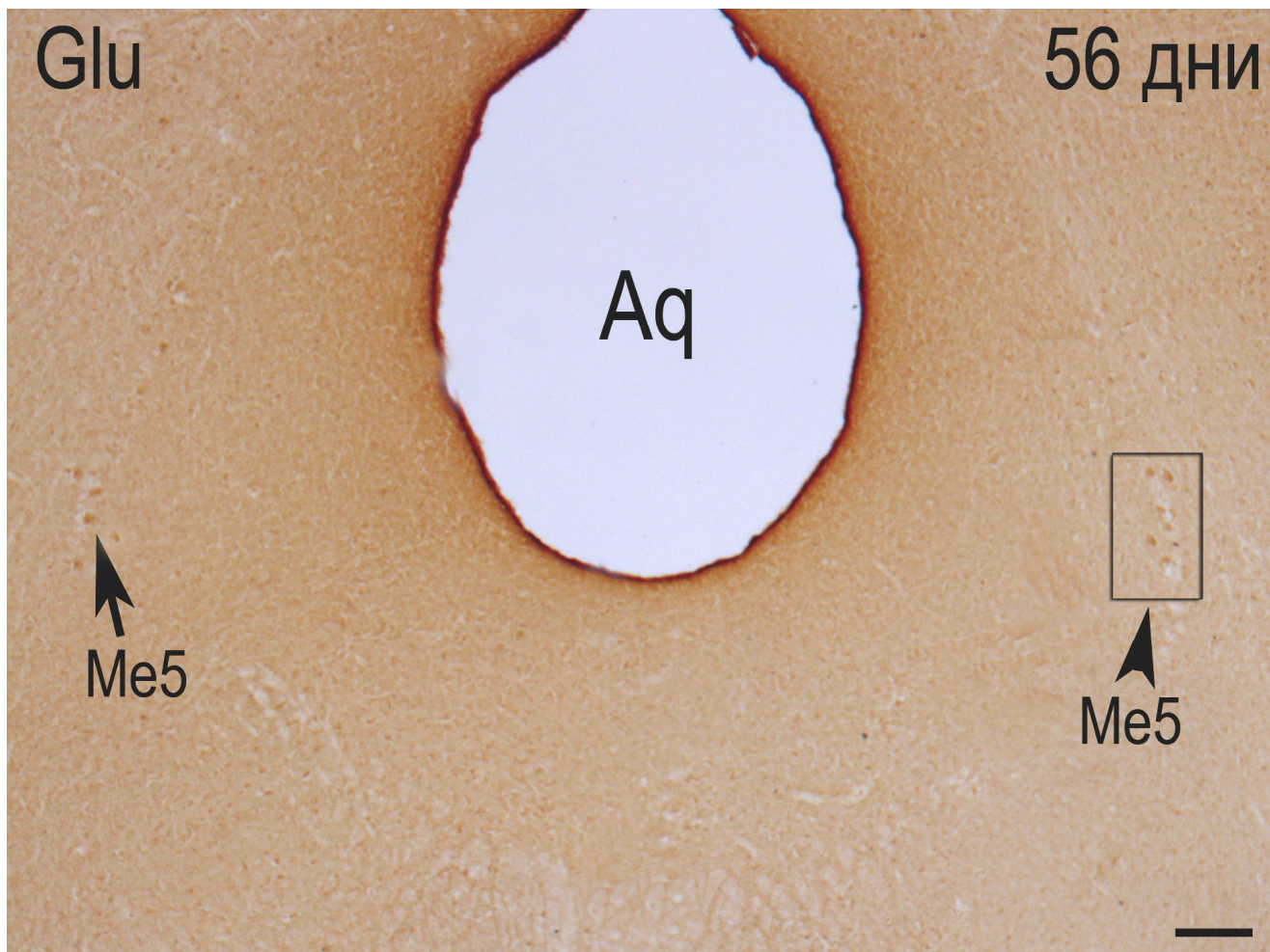
### 4.3. Неврохимични промени в мезенцефалното тригеминално ядро след периферна аксотомия

#### 4.3.1. Пластични промени в експресията на класически невротрансмитери

От изследванията ни върху невротрансмитерната принадлежност на мезенцефалните тригеминални неврони в нормални условия е известна тяхната глутаматергична природа. Ето защо в настоящето изследване ние проследихме промените в експресията на тази аминокиселина след експериментално едностранно прерязване на *n. massetericus* и последваща имунохистохимия за демонстриране на неговото наличие в изследваното ядро. Една седмица след аксотомията по цялото протежение на ядрото на страната на увредата установихме намалена имунореактивност към глутамат в засегнатите неврони (фиг. 4.19А), в сравнение с експресията ѝ в интактните Me5 неврони (фиг. 4.19Б). Отчетлива тенденция към понижен интензитет на имунооцветяване бе регистрирана и на 14-ти, 21-ви, 28-ми ден след оперативната интервенция, а 56 дни след нея броят и интензитетът на имунооцветяване на увредените неврони се доближи до този на незасегнатите такива (фиг. 4.20).

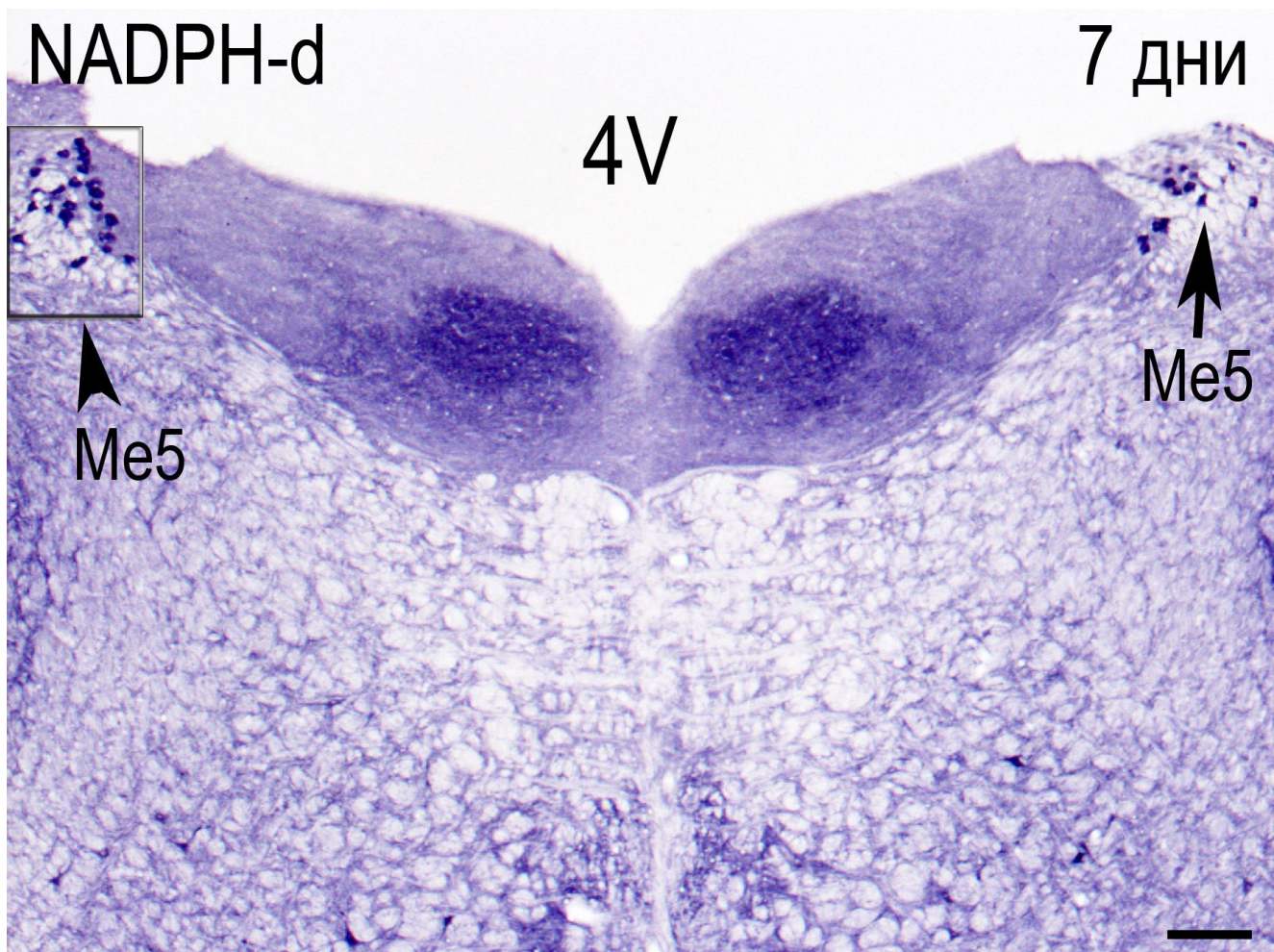


**Фигура 4.19.** Имунохистохимична реакция за глутамат (Glu) в каудалната част на Me5 у плъх 7 дни след едностранно прерязване на *n. massetericus*. Броят на Glu-имунореактивните мезенцефални тригеминални неврони и интензитетът на тяхното оцветяване на аксотомизираната страна (А) е по-малък в сравнение на броя и интензитетът на имунооцветяване на Me5 неврони на интактната страна (Б). Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



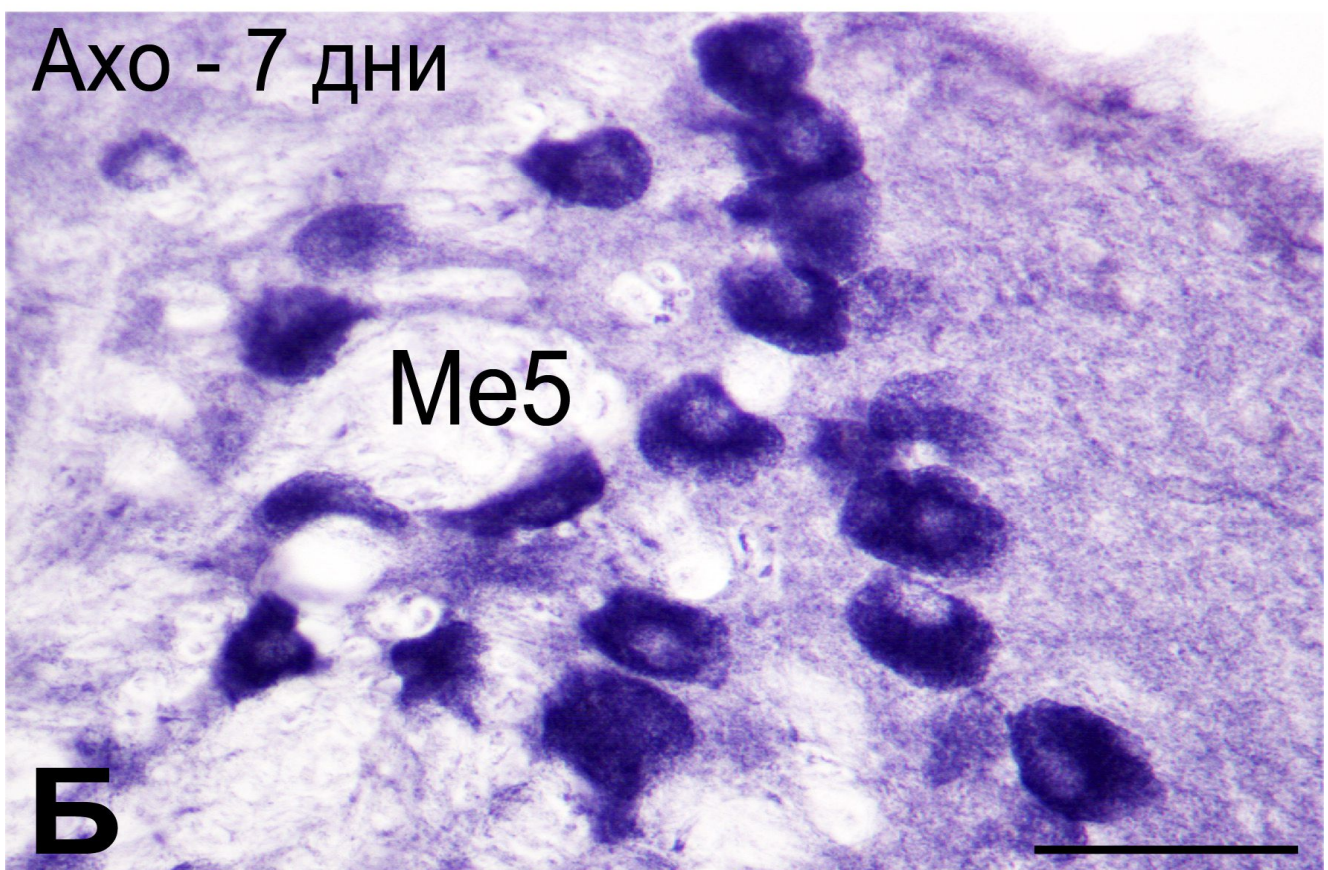
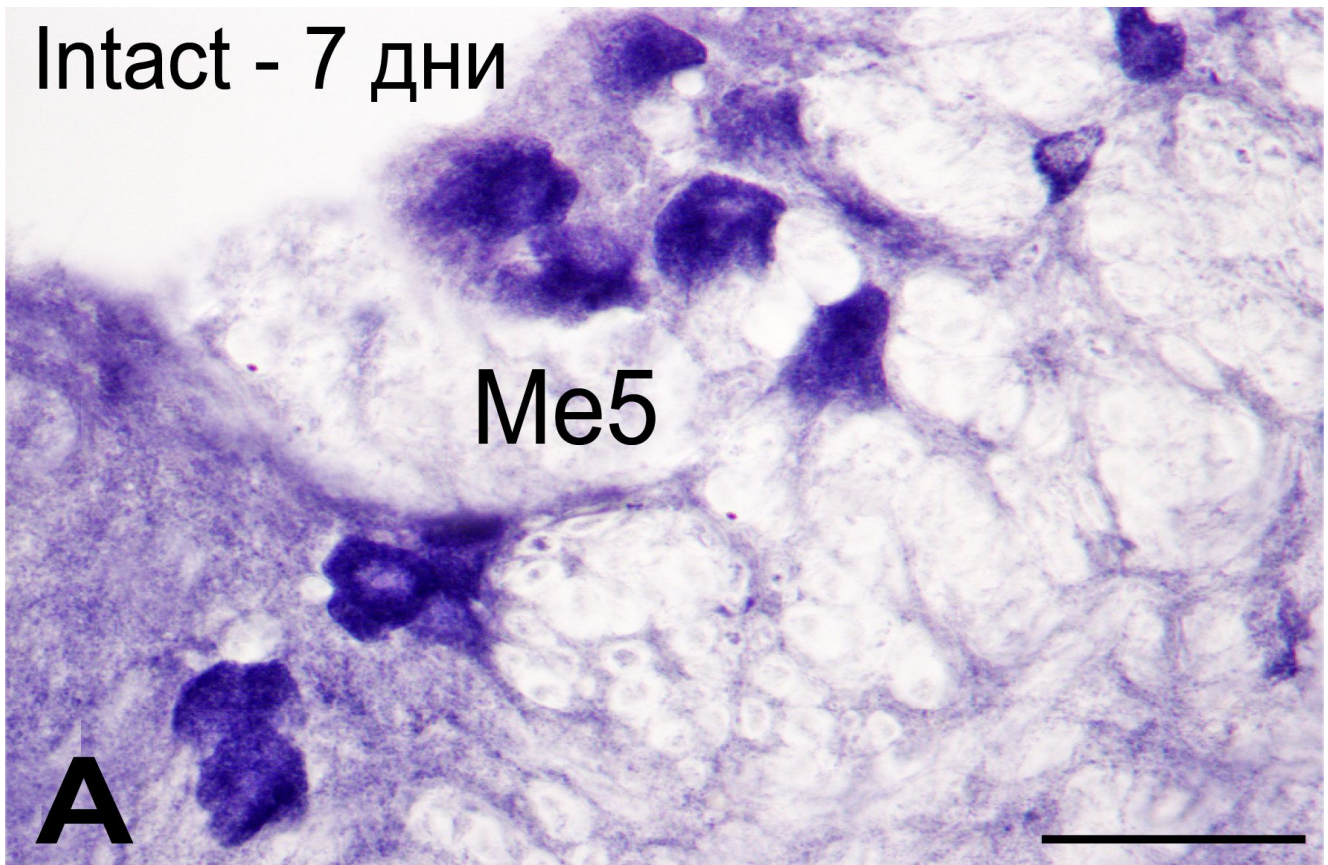
**Фигура 4.20.** Имунохистохимична реакция за глутамат (Glu) в ростралната част на Me5 у плъх 56 дни след едностранно прерязване на *p. massetericus*. Броят на Glu-имунореактивните мезенцефални тригеминални неврони и интензитетът на тяхното оцветяване на аксотомираната страна (глава на стрелка) са приблизително еднакви в сравнение с тези на невроните на интактната мозъчна половина (стрелка). Aq, *aqueductus cerebri*. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

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

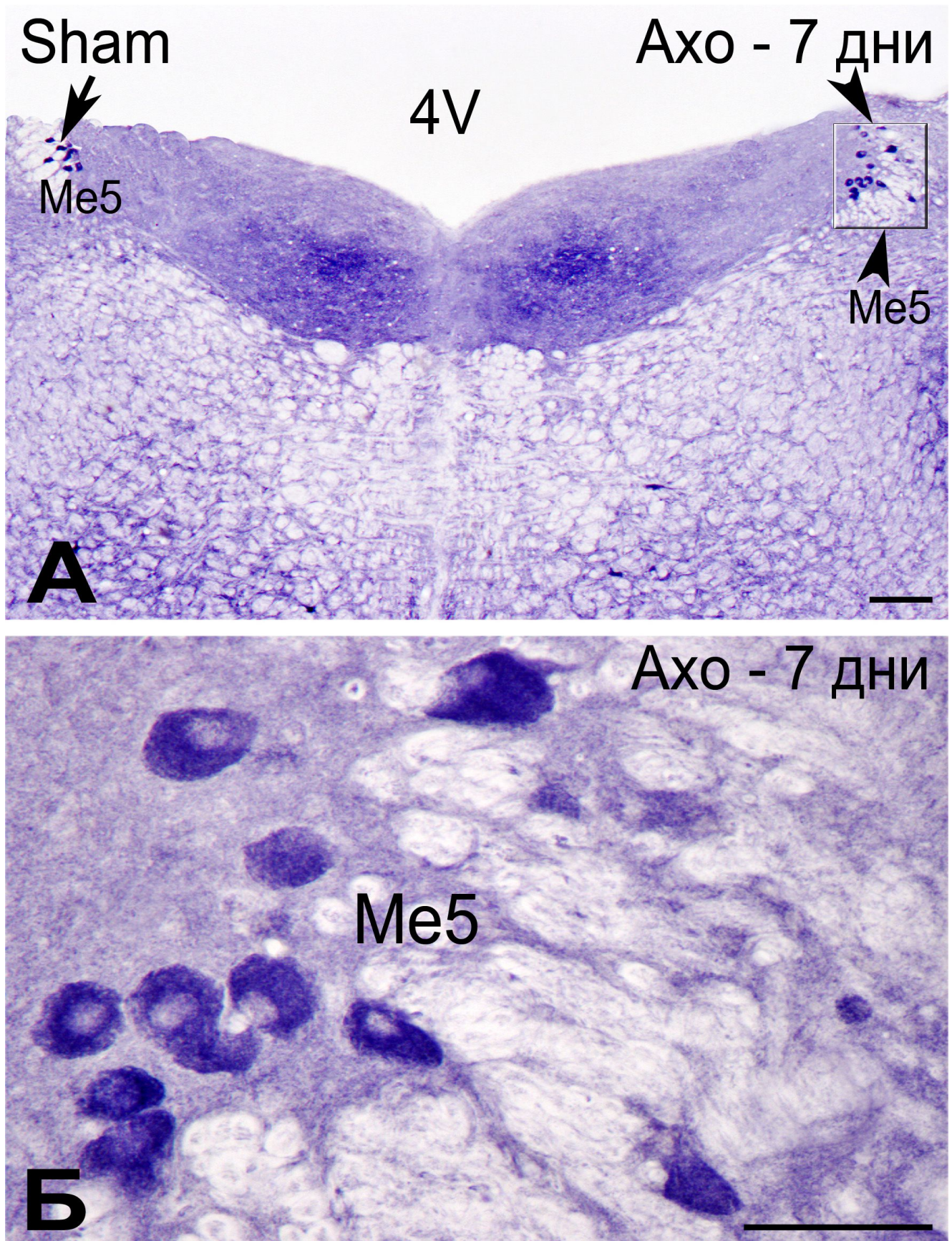


**Фигура 4.21.** Хистохимична реакция за NADPH-диафороза в каудалната част на Me5 у плъх. Седем дни след аксотомията броят на реактивните Me5 неврони на страната на увредата (глава на стрелка) е по-голям в сравнение с този в ядрото на интактната мозъчна половина (стрелка). Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

Прилагайки хистохимична реакция за визуализация на NADPH-диафороза, ние установихме че седем дни след интервенцията, броят на нитрергичните Me5 неврони е увеличен на страната на увредата в сравнение с интактната страна (фиг. 4.21, 4.22). Подобна е находката при сравнение броя на реактивните Me5 неврони на аксотомираната и лъжливо оперираната страна (фиг. 5.23). Тенденцията за повишаване на броя на аксотомираните нитрергични мезенцефални тригеминални неврони бе наблюдавана до края на първия постоперативен месец. Два месеца след интервенцията, обаче, не бе установена видима промяна в броя на NADPH-диафороза реактивните Me5 неврони между оперираната и интактната мозъчна половина.



**Фигура 4.22.** Голямо увеличение на фиг. 4.21, демонстриращо разликата в броя на интактните (А) и аксотомирани (Б) NADPH-диафораза реактивни Me5 неврони. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



**Фигура 4.23.** (А) 7 дни след интервенцията, броят на аксотомираните NADPH-диафораза реактивни Me5 неврони (глава на стрелка) е по-голям в сравнение с този на невроните на лъжливооперираната страна (стрелка). (Б) По-голямо увеличение на ядрото от страната на увредата. Мащабна скала = 100  $\mu\text{m}$  (А); 50  $\mu\text{m}$  (Б).

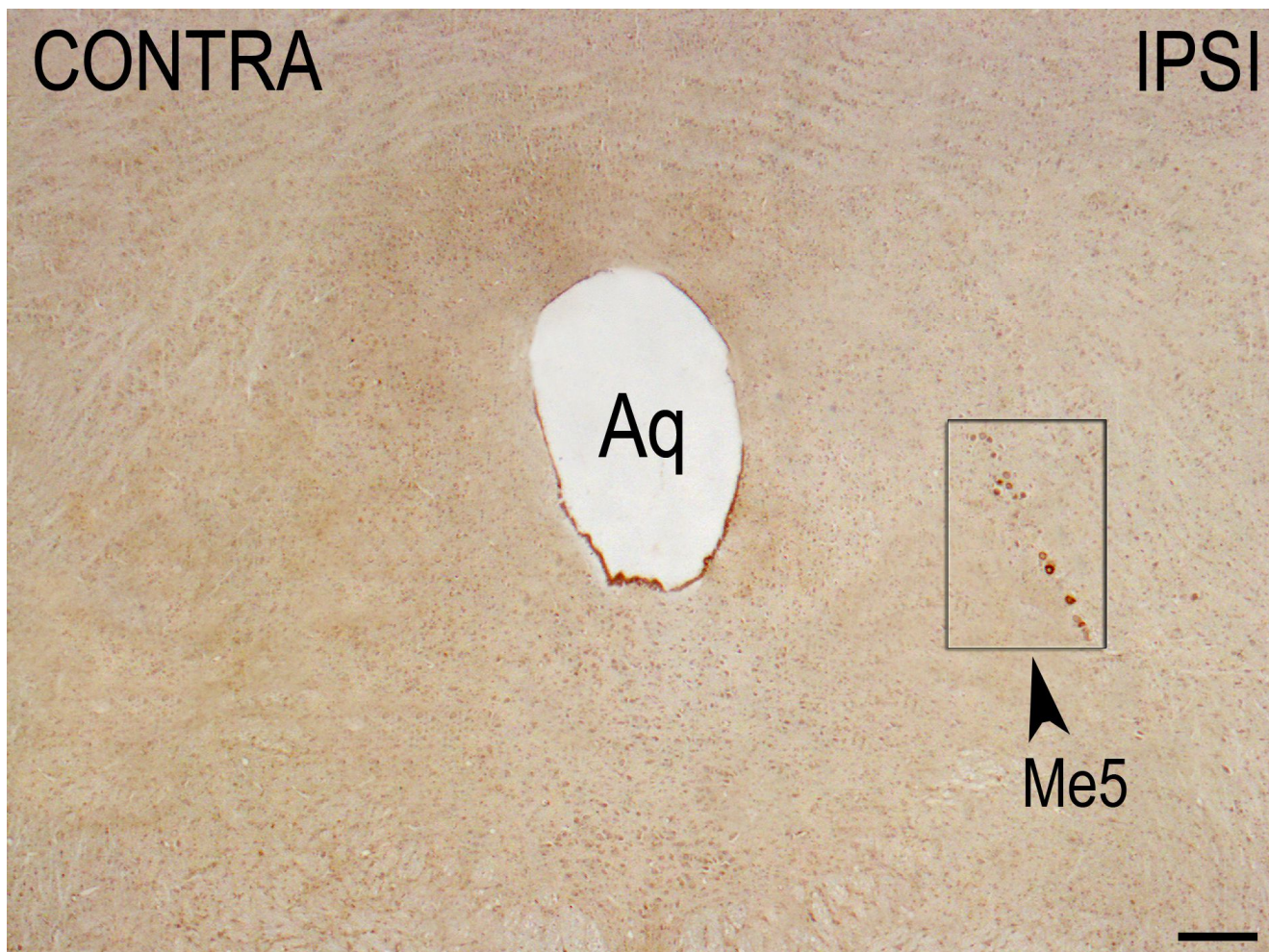
#### 4.3.2. Пластични промени в експресията на невроактивни пептиди

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

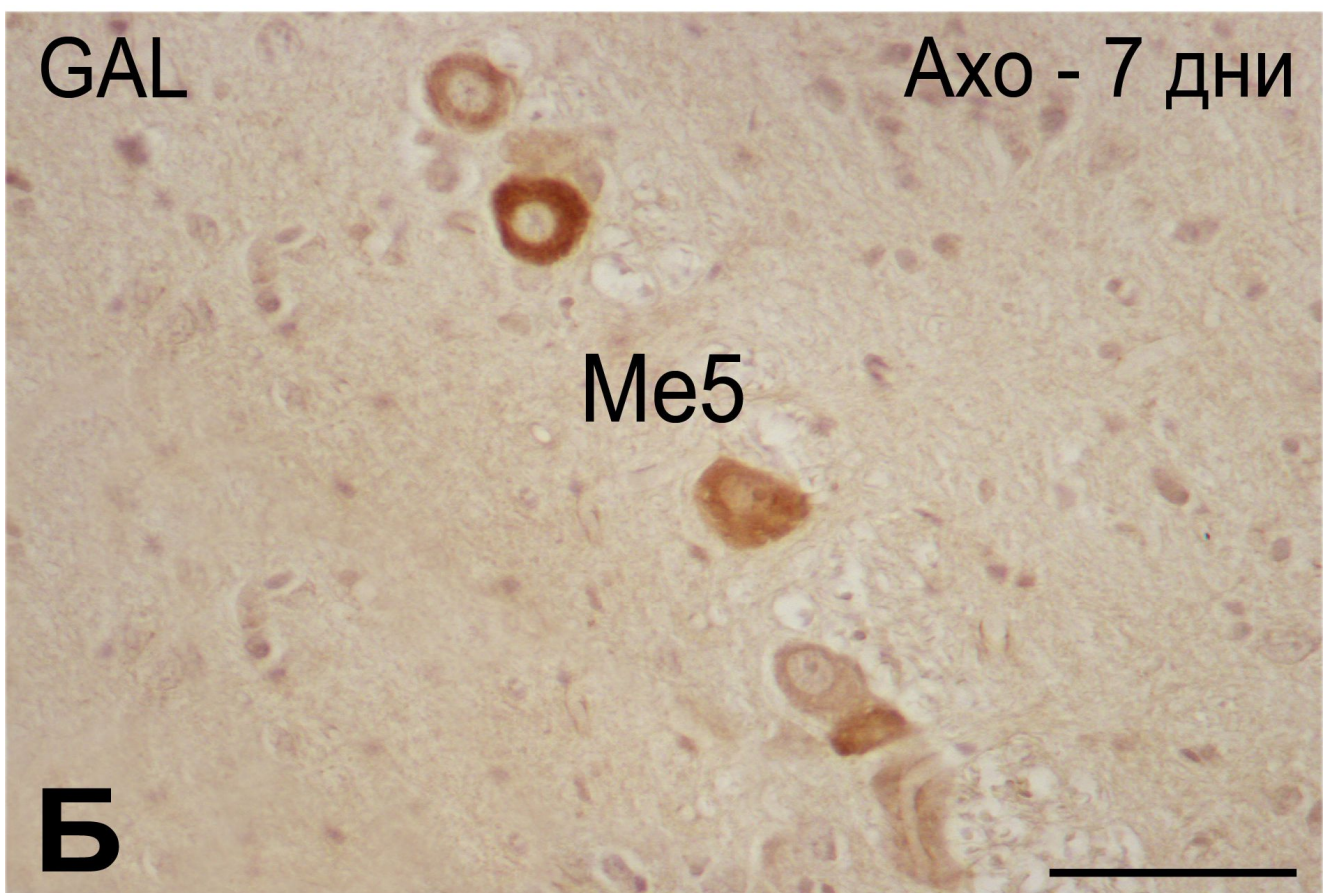
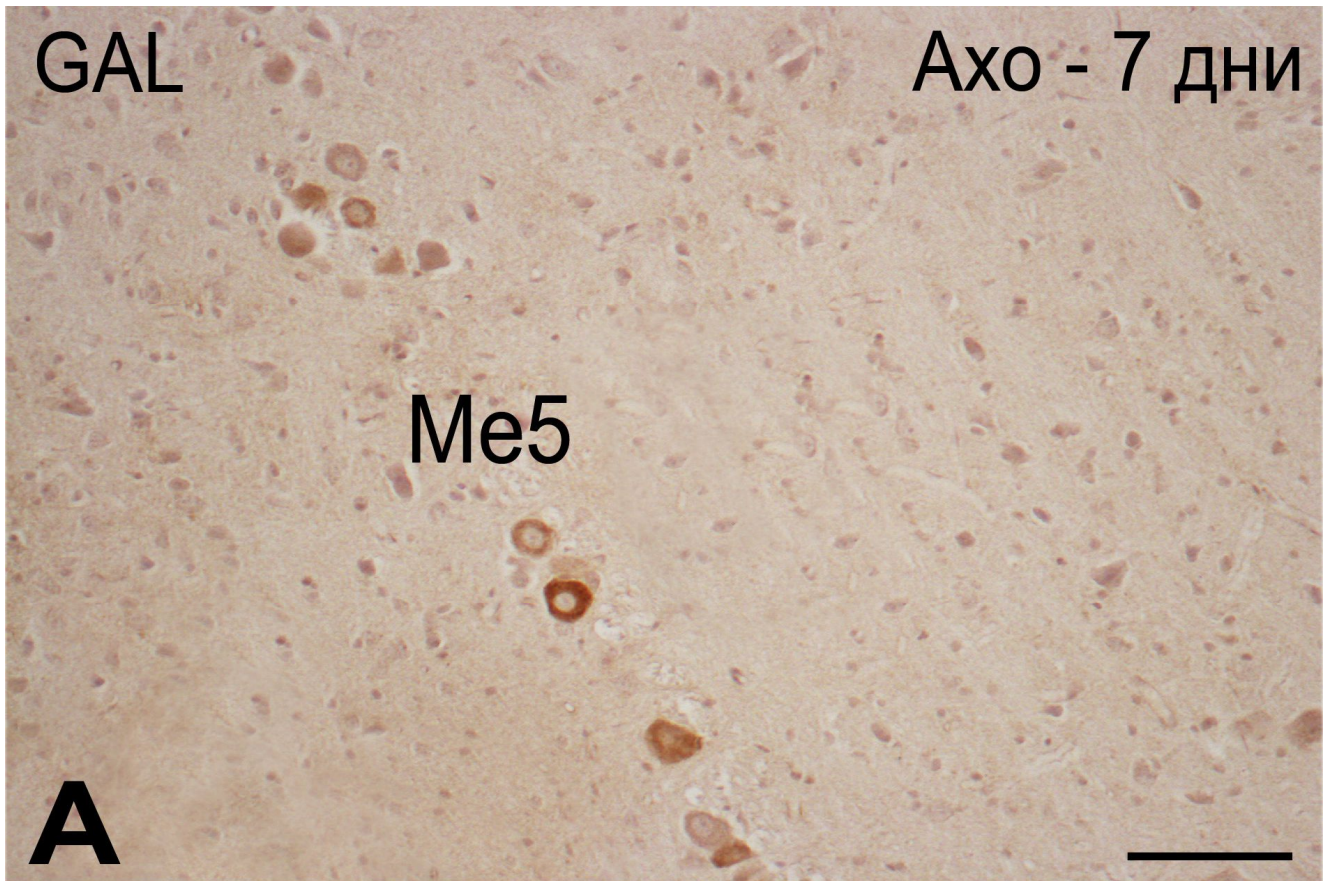
След прилагане на антитела срещу SP и CGRP, ние не успяхме да установим наличие на тези два пептида в клетъчните тела и/или израстъците на аксотомираните мезенцефални неврони по цялото ростокаудално разположение на Me5 в нито един от изследваните периоди на преживяване след едностранната периферна аксотомия.

Реакцията за GAL в животните, субект на едностранна аксотомия, бе подчертано позитивна в ипсилатералната страна, докато контралатерално тя бе негативна. Положително имунооцветяване беше наблюдавано и в невроните на съседните ядра – *locus coeruleus* и медиално парабрахиално ядро. Положителна GAL-имуноореактивност ясно бе забелязана в големите по размери аксотомирани Me5 неврони по цялото ростокаудално протежение на ядрото, и в единични малки неврони в мостовата част на ядрото. Тя бе позитивирана още на 7-ия ден след прерязването на нерва, персистираще две до четири седмици след това и постепенно затихваше към 56-ти ден след интервенцията (фиг. 4.24, 4.25).

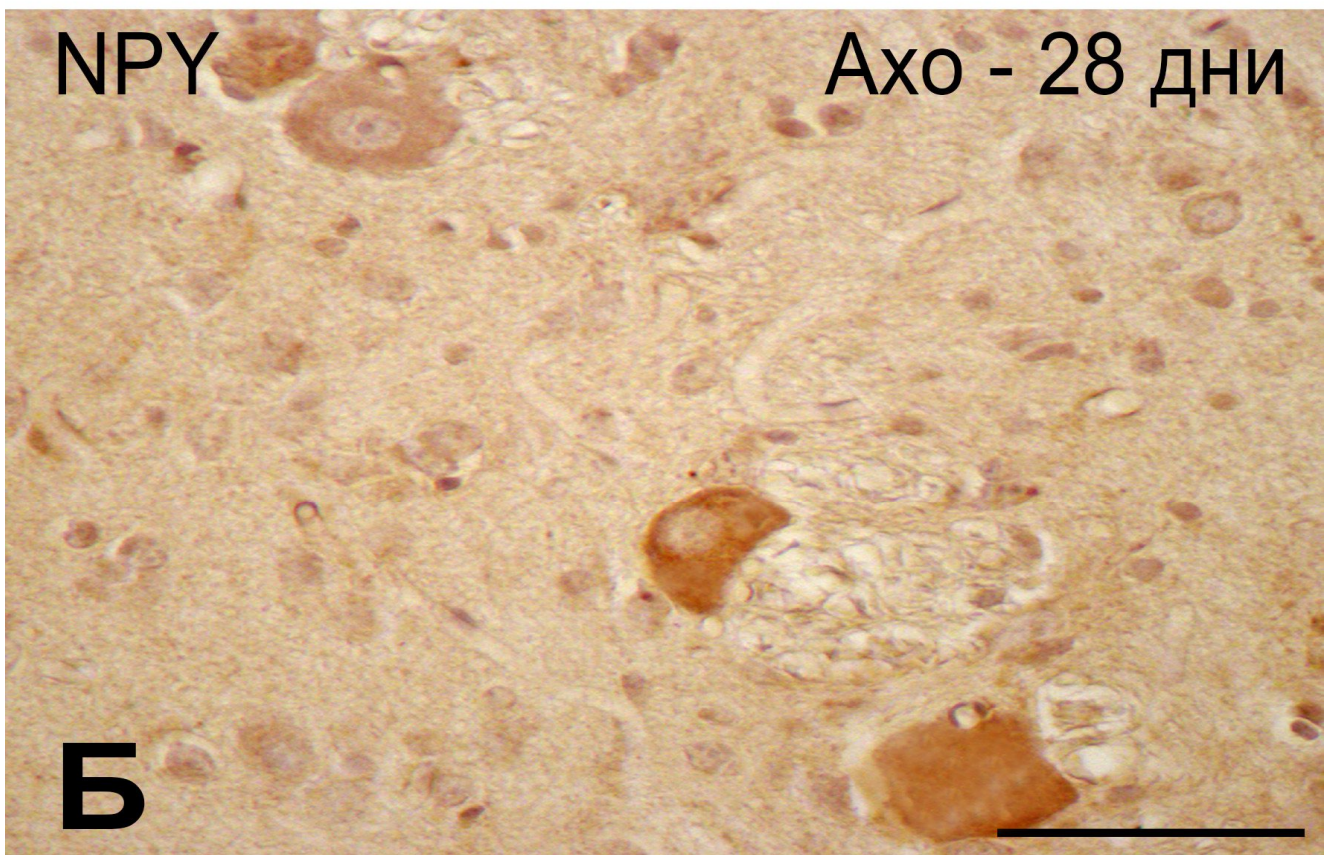
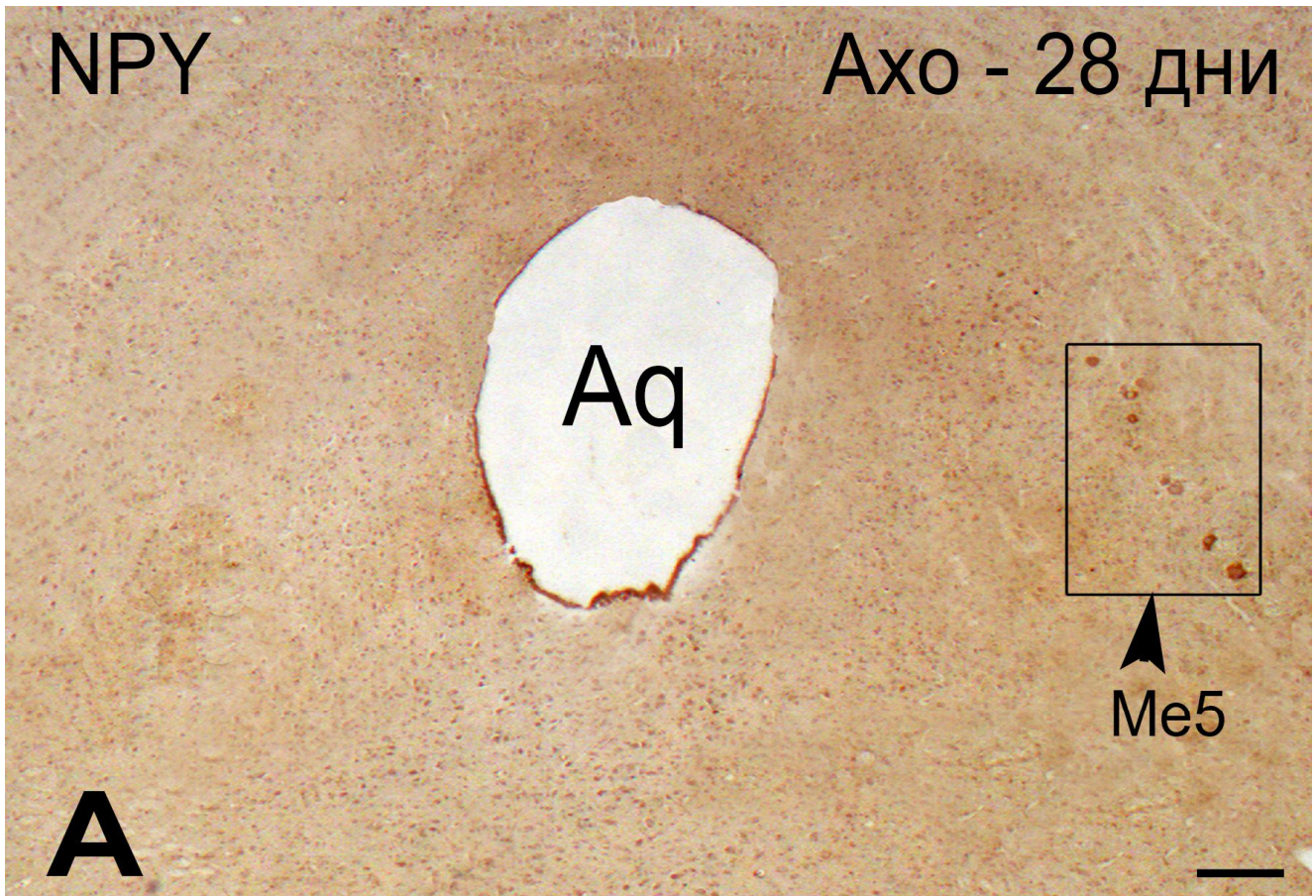
Подобна бе реакцията и за другите изследвани от нас невропептиди – VIP и NPY, но интензитетът на наблюдаваната имунореактивност в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони бе сравнително по-слаба. По-конкретно ние установихме, че 14 дни след аксотомията реакцията за NPY бе с почти същата интензивност, но с лека тенденция към намаляване, което е видимо забележимо на 28-ия ден след оперативната процедура (фиг. 4.26).



**Фигура 4.24.** Имунохистохимична реакция за GAL в Me5 у плъх на ниво среден мозък 7 дни след експериментално едностранно прерязване на *p. massetericus*. Отбележете появата на GAL-имунореактивни мезенцефални тригеминални неврони (глава на стрелка) на ипсилатералната на аксотомията страна и тяхната липса на интактната контралатерална мозъчна половина. Aq, *aqueductus cerebri*.  
Мащабна скала = 100  $\mu$ m.



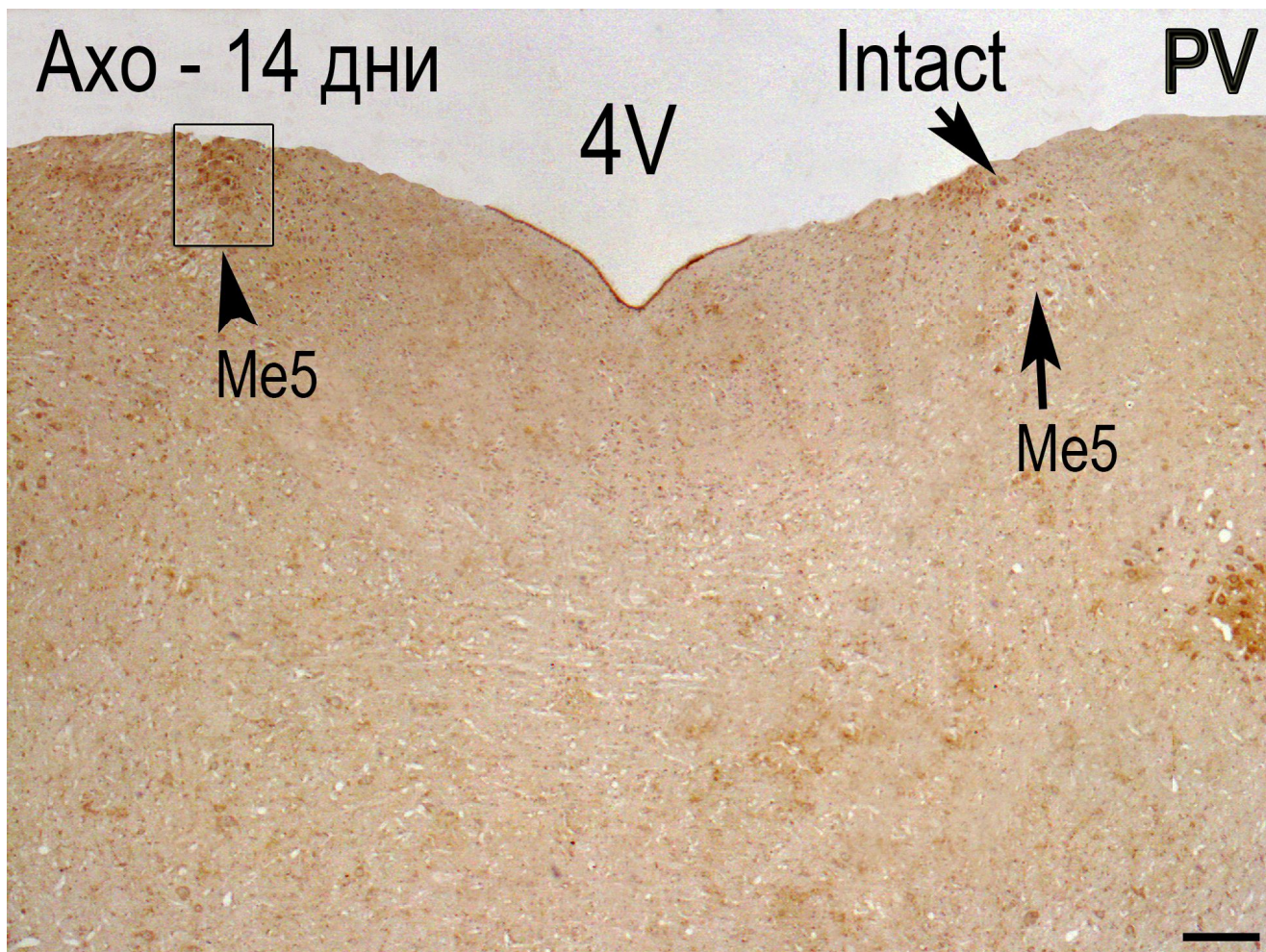
**Фигура 4.25.** (А, Б) По-големи увеличения на правоъгълника, очертан в предишната микрофотография, показващ GAL-имунореактивни аксотомирани Me5 неврони 7 дни след оперативната интервенция. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



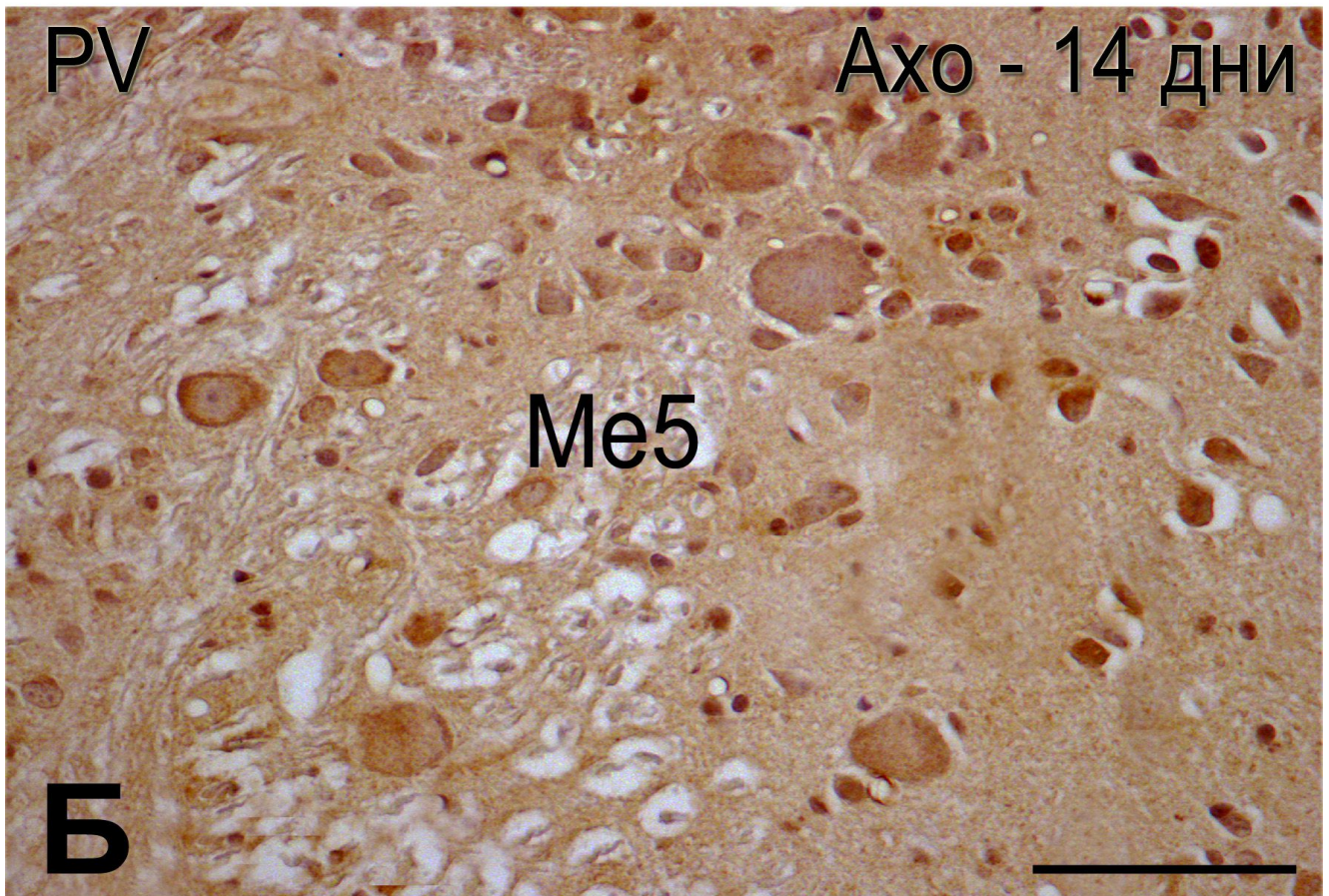
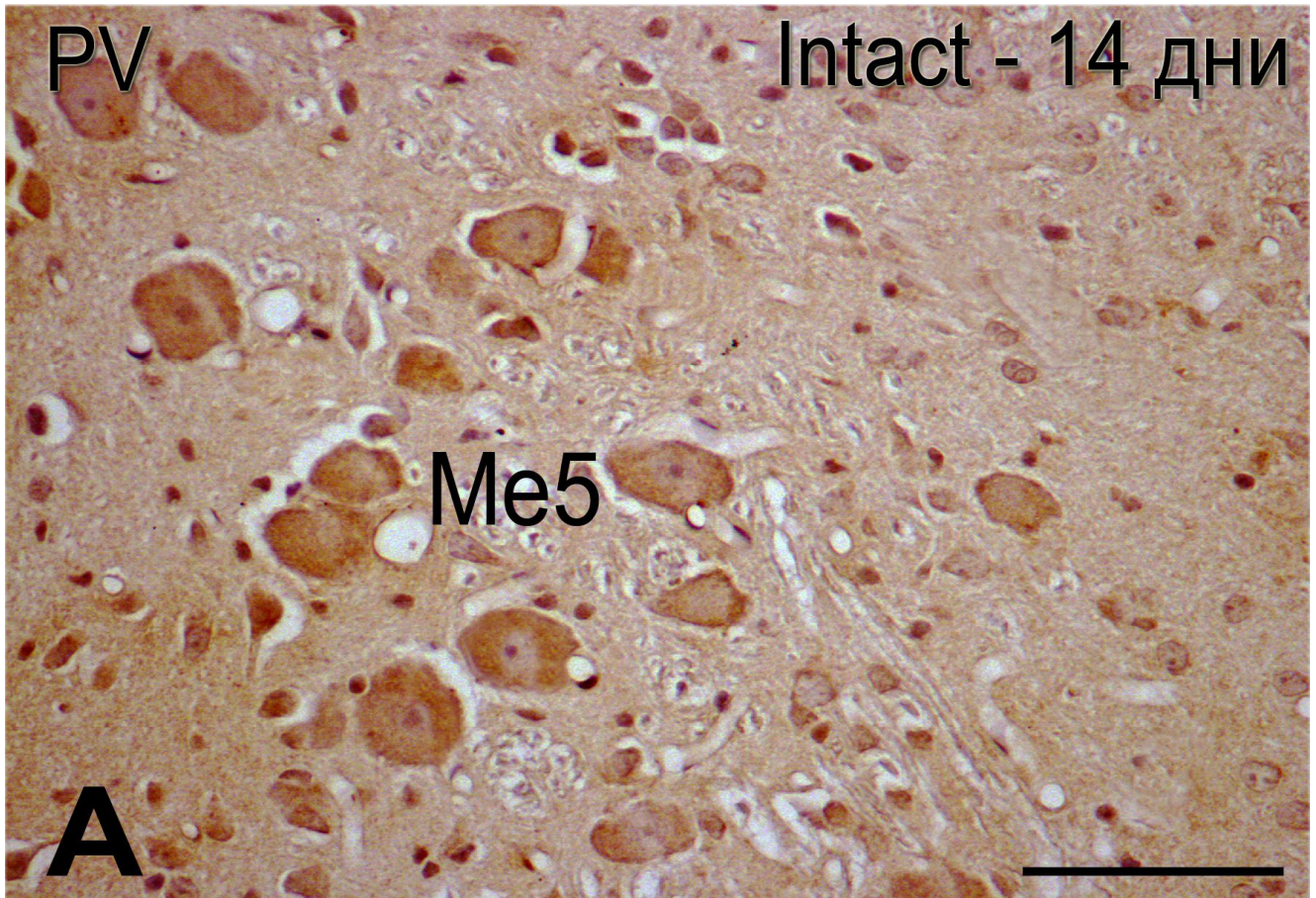
**Фигура 4.26.** (А, Б) NPY-имунореактивни аксотомирани Me5 неврони (глава на стрелка) в средномозъчната част на ядрото 28 дни след периферна аксотомия. Aq, aqueductus cerebri. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.

### 4.3.3. Пластични промени в експресията на калций-свързващи протеини

В ранните етапи (до една седмица) след унилатерално прерязване на *n. massetericus*, не установихме видими промени в имунохистохимичното съдържание на някои неврон-специфични калций-свързващи протеини като парвалбумин и калбиндин D-28 в мезенцефалните тригеминални неврони от засегнатата мозъчна страна. Имунобелязаните неврони от двете страни бяха със средни и големи по размери клетъчни тела и ясна псевдоуниполярна морфология. Мезенцефалните тригеминални неврони в интактното ядро също показваха имунореактивност към парвалбумин и калбиндин с приблизително еднакъв интензитет на оцветяване и малки различия в модела на имунооцветяване. За отбелязване е, обаче, че калбиндин-имунореактивните неврони в Me5 бяха по-малобройни в сравнение с парвалбумин-имунопозитивните такива в ядрото. След преживяване от 7 постоперативни дни не успяхме да регистрираме забележима промяна в експресионния профил на двата изследвани от нас калций-свързващи протеини в интактните и аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони. Две седмици след аксотомията наблюдавахме намаление в експресионните им нива в аксотомираните Me5 неврони по цялото протежение на ядрото, като това намаление бе значително по-силно изразено за парвалбумин (фиг. 4.27, фиг. 4.28), и бе по-незначително, но ясно забележимо, за калбиндин. Броят на парвалбумин-съдържащите Me5 неврони ипсилатерално на нервното прерязване бе по-малък отколкото този, наблюдаван в контролните животни, докато броят на калбиндин-съдържащите невронални профили беше почти същият. Установените различия се отнасят до интензивността, а не до броя на имунопозитивирани неврони и бяха отчетливи при сравнение, както с контралатералните интактни Me5 неврони, така и с тези от същата страна на контролните животни, при които бе проведена само лъжлива оперативна интервенция, включваща хирургично срязване на кожата и меките тъкани без последващо прерязване на периферния нерв. 56 дни след интервенцията не беше установено ипсилатерално намаляване в експресията на калций-свързващите протеини и тяхното ниво бе почти същото, сравнимо с това в началните дни на преживяване след периферната аксотомия.



**Фигура 4.27.** Имунохистохимично демонстриране на PV в мостовата част на Me5 14 дни след едностранна периферна аксотомия. Отбележете видимо намаления брой на PV-имунореактивните мезенцефални тригеминални неврони на аксотомираната страна (глава на стрелка) в сравнение с този на интактната мозъчна половина (стрелка). 4V, ventriculus quartus. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



*Фигура 4.28. По-големи увеличения на интактните (А) и аксотомирани (Б) PV-имунореактивни Me5 неврони от предишната фигура. Мащабна скала = 50  $\mu$ m.*

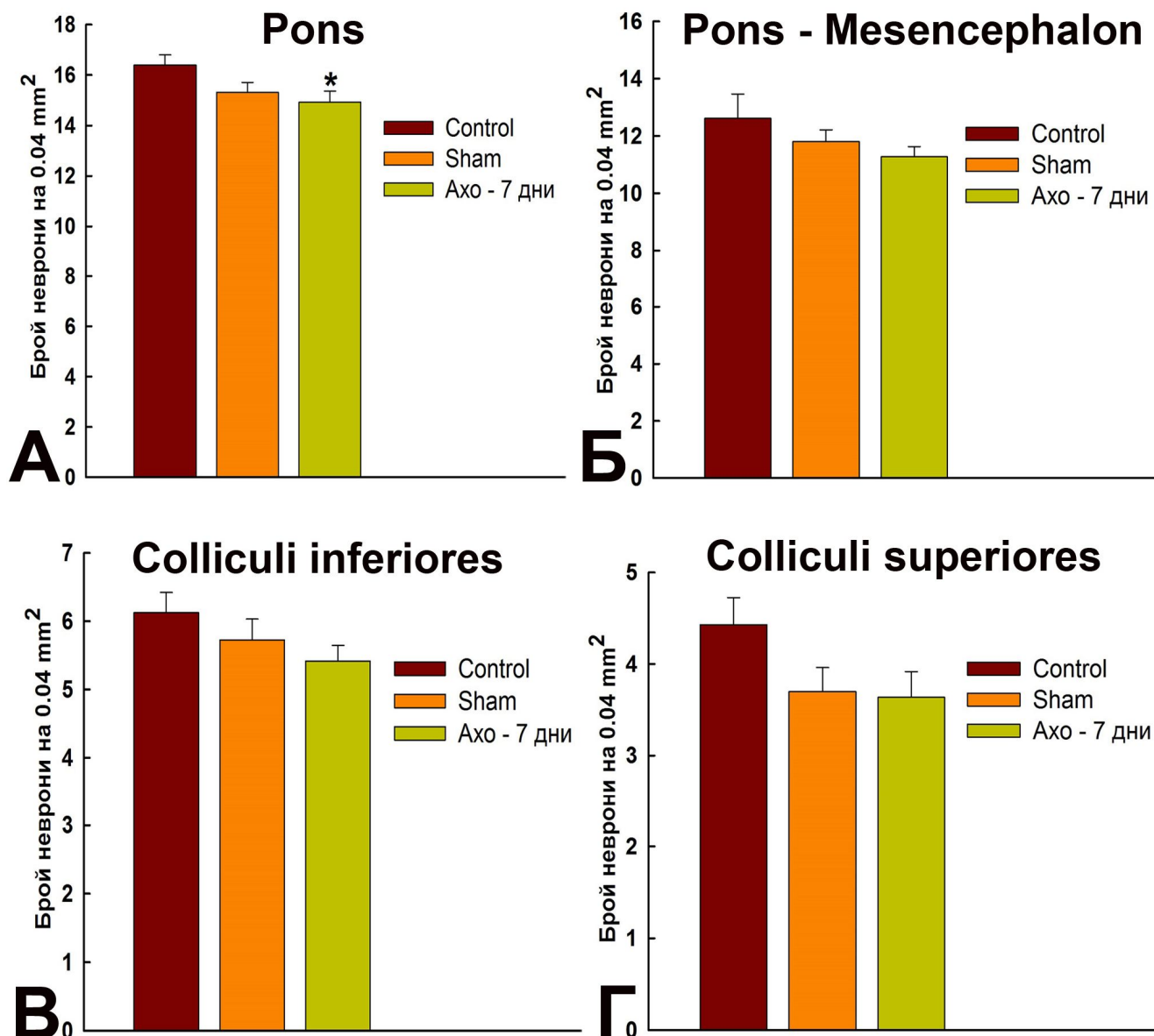
#### 4.4. Статистически анализ на резултатите

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

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

За всяка група плъхове сме анализирали броя на мезенцефалните тригеминални неврони на единица площ от  $0.04 \text{ mm}^2$ , при дебелина на парафиновите срезове от  $7 \mu\text{m}$ , на 4 rostrocaudални мозъчни нива, а именно: на ниво мост (*pons*), преходна зона (*pons-mesencephalon*), *colliculi inferiores* и *colliculi superiores*. Получените резултати бяха анализирани с помощта на статистическа програма SigmaStat® 11.0 софтуерен пакет (Systat Software Inc). Експерименталните данни бяха сравнени с помощта на Student's *t*-test, като за статистически значими различия бяха приемани тези, при които стойността на  $p < 0.05$ .

При 7-дневните аксотомирани животни беше наблюдавано незначително понижение в броя на мезенцефалните тригеминални неврони и на четирите коронарни мозъчни нива в сравнение с контролната и фалшиво-оперираната група. Необходимо е да направим и уточнението, че само на ниво *pons* бе наблюдавано статистически значимо ( $p=0.017$ ) понижение в броя на невроните в Me5 от  $16.393 \pm 0.403$  при контролната група на  $14.920 \pm 0.443$  при Ахо – 7 дни (фиг. 4.29).



**Фигура 4.29.** Схематично представяне на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) група, както и аксотомираните и преживели 7 дни плъхове (Axo – 7 дни) на ниво *pons* (A), *pons-mesencephalon* (B), *colliculi inferiores* (V) и *colliculi superiores* (Г). Данните представят средната стойност и стандартната грешка и са сравнени с помощта на Student's t-test (броя на изследваните животни във всяка група е  $n=5$ ).  $*p<0.05$  спрямо контролната група.

Средният брой неврони в Me5 при контролната група на ниво *pons-mesencephalon* е  $12.615 \pm 0.851$  спрямо  $11.273 \pm 0.359$  при Axo – 7 дни, на ниво *colliculi inferiores* е  $6.125 \pm 0.295$  в сравнение в  $5.417 \pm 0.229$  при аксотомираните плъхове на 7 дни, а на ниво *colliculi superiores* е  $4.429 \pm 0.297$  спрямо  $3.636 \pm 0.279$  при Axo – 7 дни (фиг. 4.29). Спрямо контролната и фалшиво-оперираната група и на четирите изследвани мозъчни нива не бяха забелязани статистически значими

различия  $p > 0.05$ , въпреки че при Sham-групата беше наблюдавано слабо понижение в средния брой Me5 неврони.

Не бяха наблюдавани статистически значими различия в средния брой мезенцефални тригеминални неврони при сравнение на групите Ахо -7 дни и Sham. При Sham-групата, която в нашето изследване служи като допълнителна контрола, на ниво *pons* средният брой неврони бе  $15.308 \pm 0.399$ , на ниво *pons-mesencephalon* бе  $11.800 \pm 0.416$ , на ниво *colliculi inferiores* бе  $5.727 \pm 0.304$ , а на ниво *colliculi superiores* той беше  $3.700 \pm 0.260$  (фиг. 4.29).

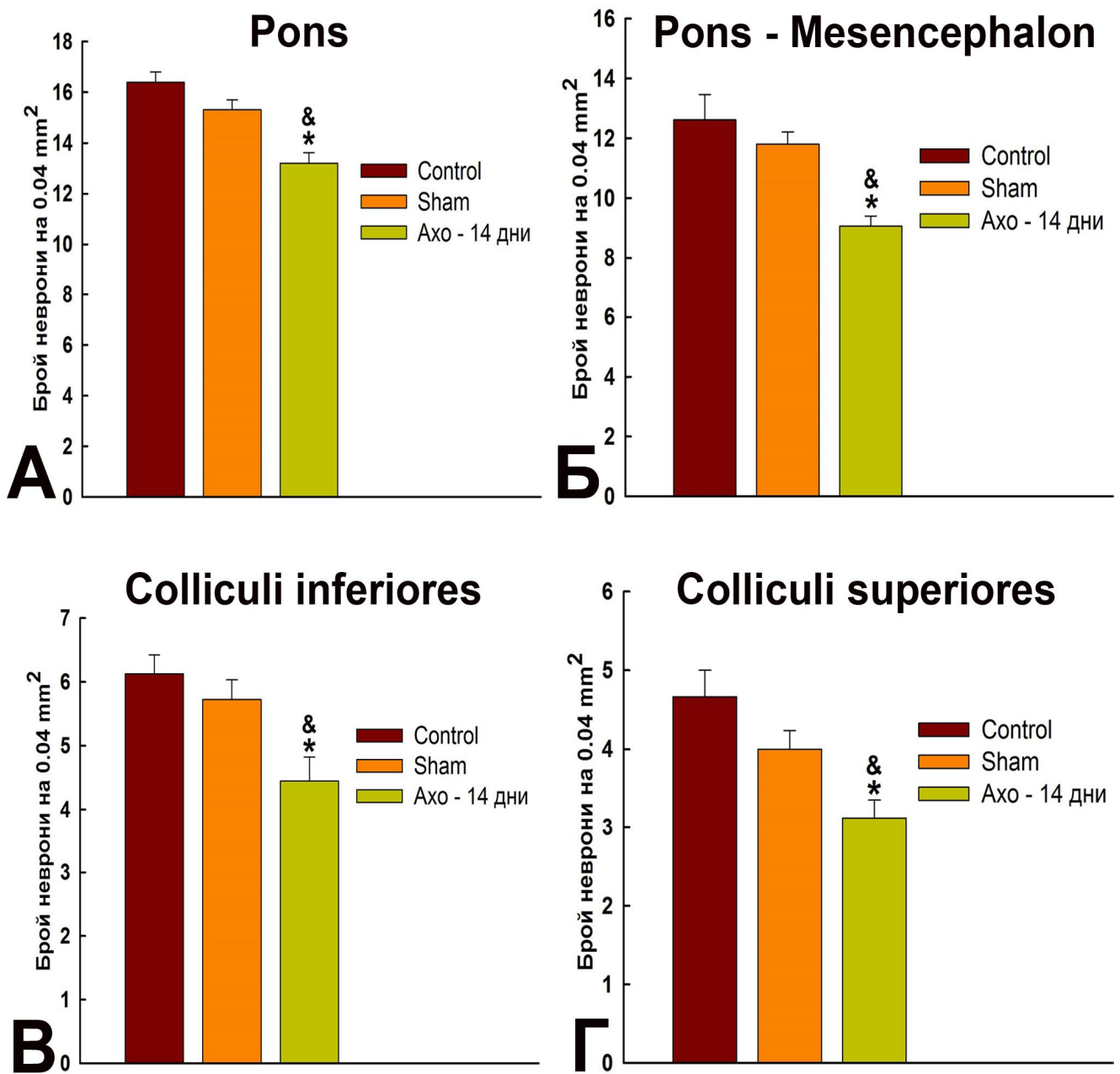
Интересни резултати получихме при анализ на резултатите от преживелите 14 дни след интервенцията плъхове след едностранна аксотомия. От каудално към роstralно броят на невроните в Me5 от страната на аксотомията се променяше от  $13.200 \pm 0.416$  в *pons*, на  $9.063 \pm 0.335$  в *pons-mesencephalon*, на  $4.444 \pm 0.377$  на ниво *colliculi inferiores* и  $3.125 \pm 0.227$  в *colliculi superiores*. При това, във всички изследвани зони невроналната загуба от страната на аксотомията е статистически значима  $p < 0.05$  в сравнение с контролните и Sham-групите на съответните нива (фиг. 4.30).

При Ахо – 21 дни ефектът от едностранното прерязване на *n. massetericus* се забелязваше най-силно, тъй като при тази група и в четирите изследвани области от каудална в роstralна посока невроналната загуба беше най-значима, а именно:  $11.923 \pm 0.265$  в *pons*,  $8.222 \pm 0.173$  в *pons-mesencephalon*,  $3.824 \pm 0.231$  на ниво *colliculi inferiores* и  $2.875 \pm 0.125$  на ниво *colliculi superiores* (фиг. 4.31). Невроналната загуба от страната на аксотомията бе статистически значима  $p < 0.05$  както спрямо контролните групи, така и спрямо Sham-групите на съответните нива (фиг. 4.31).

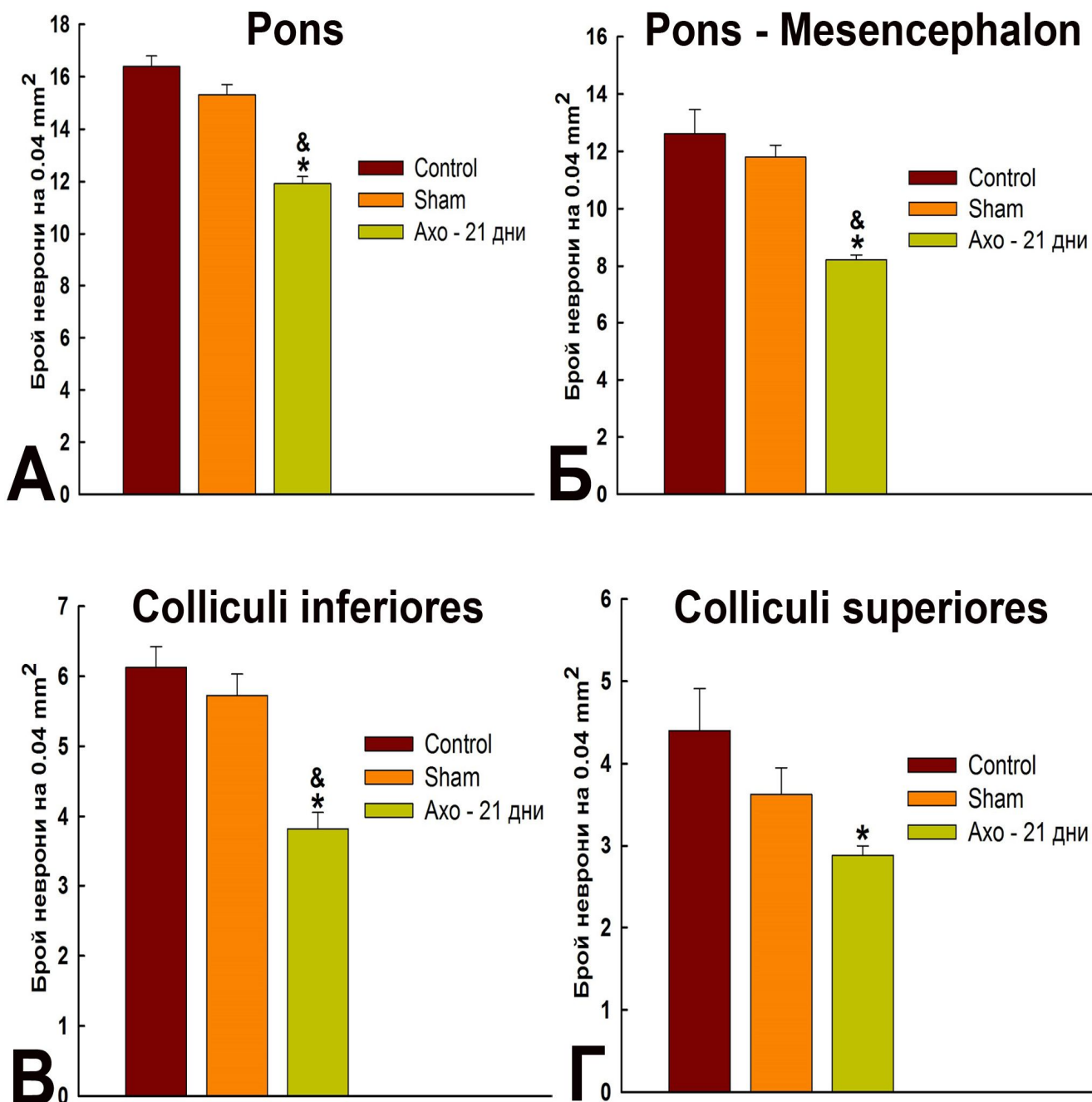
При животните преживели 28 дни след едностранната периферна аксотомия в изследваните области продължаваша невронална загуба вече не беше наблюдавана, а регистрирахме леко покачване в средния брой неврони в съответните области, като стойностите, започвайки от каудално към роstralно бяха както следва:  $13.333 \pm 0.362$  в *pons*,  $9.550 \pm 0.235$  в *pons-mesencephalon*,  $4.700 \pm 0.260$  на ниво *colliculi inferiores* и  $3.125 \pm 0.125$  на ниво *colliculi superiores* (фиг. 4.32).

При Ахо – 56 дни броят на мезенцефалните тригеминални неврони от страната на аксотомията се доближаваше по стойност до резултатите, които наблюдавахме при Ахо – 7 дни. Статистически значими различия установявахме единствено

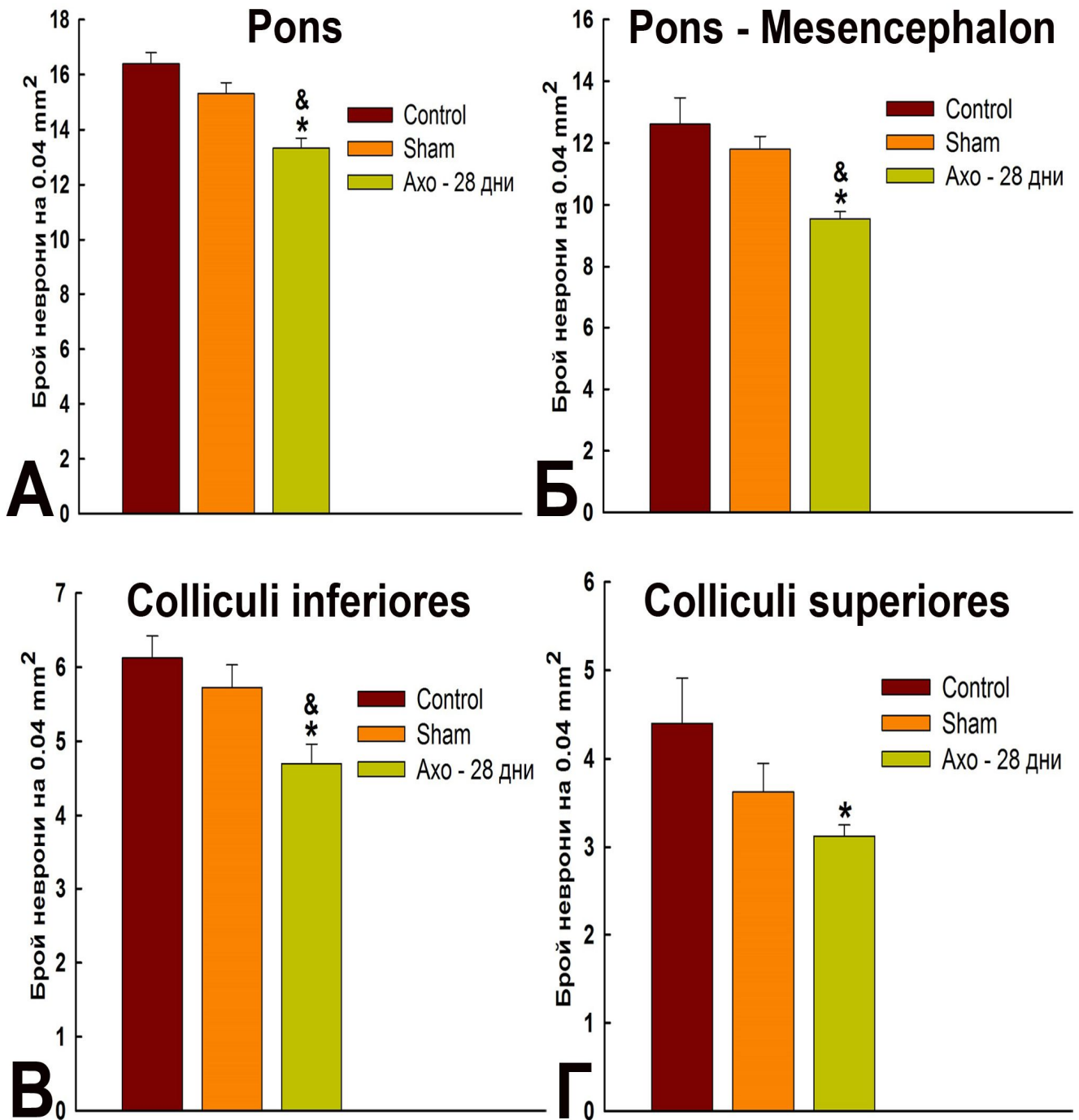
между контролната и аксотомираната група животни на нива *pons* и *colliculi inferiores*.



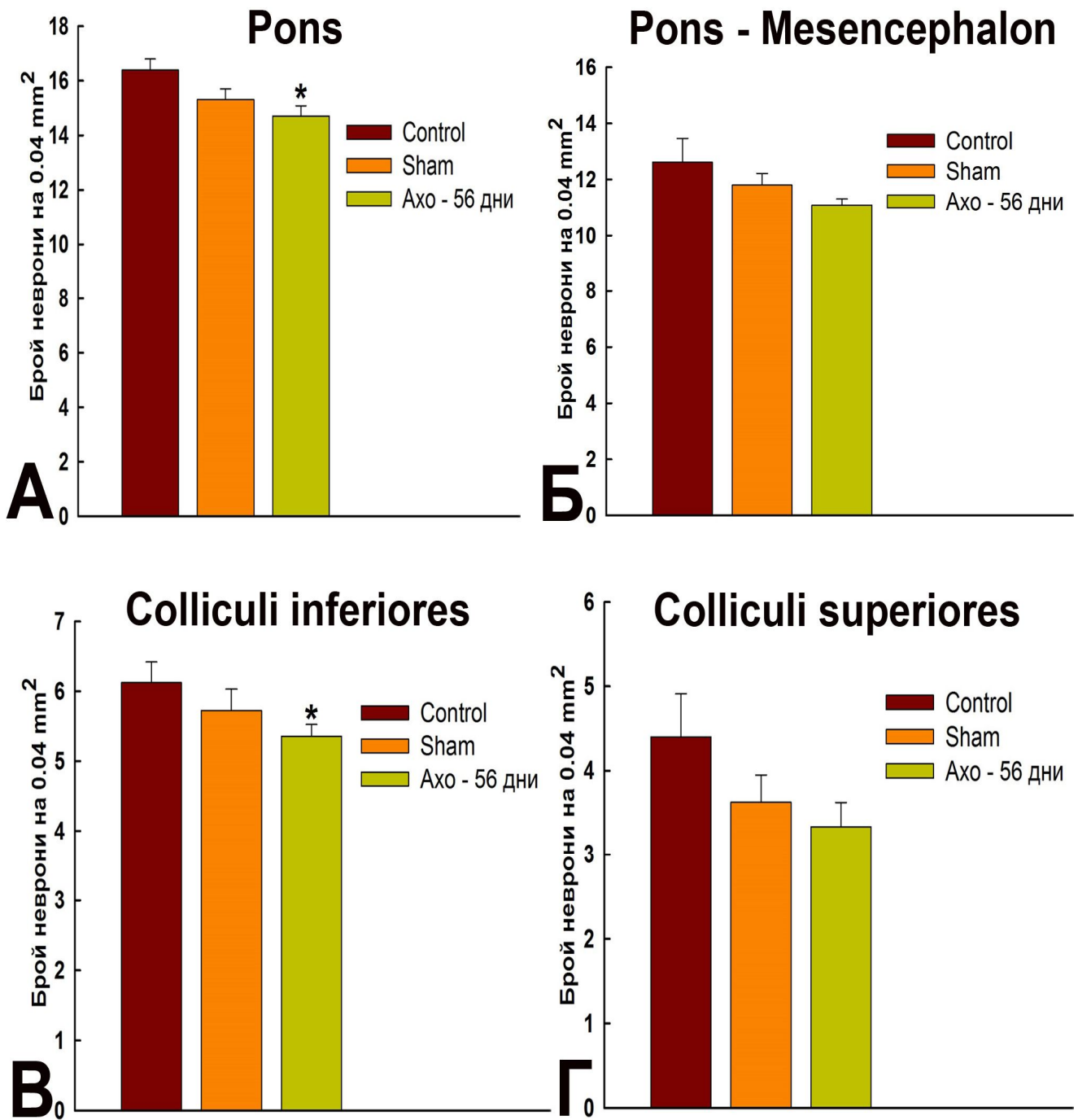
**Фигура 4.30.** Графично визуализиране на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните на 14 дни плъхове (Ахо – 14 дни) на ниво *pons* (А), *pons-mesencephalon* (Б), *colliculi inferiores* (В) и *colliculi superiores* (Г). Данните са сравнени със Student's *t*-test и демонстрират средната стойност и стандартната грешка ( $n=5$ ). \* $p<0.05$  спрямо контролната група; & $p<0.05$  спрямо фалшиво-оперираната група.



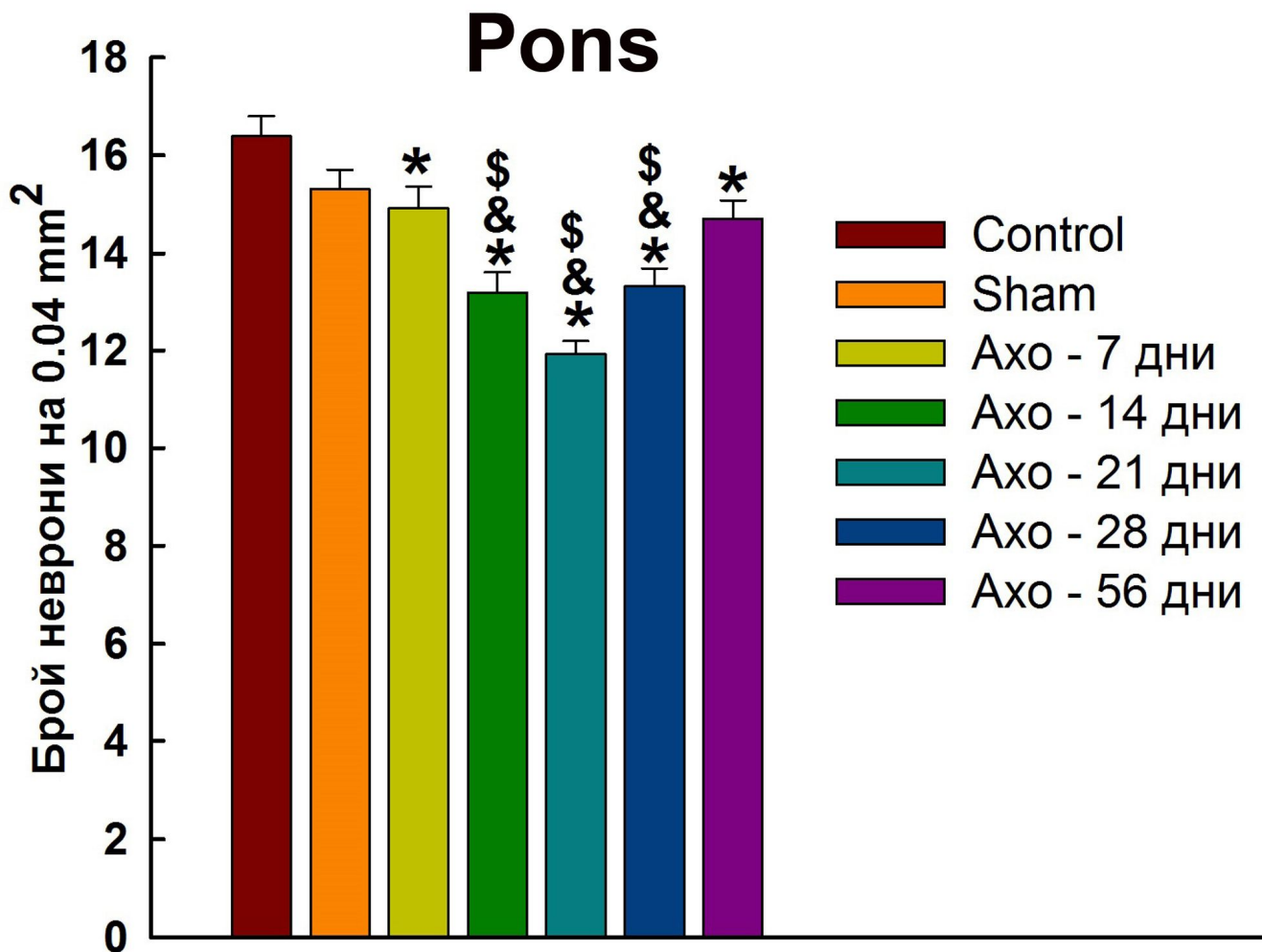
**Фигура 4.31.** Статистическо представяне на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните на 21 дни плъхове (Axo – 21 дни) на ниво pons (A), pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (B) и colliculi superiores (Г). Данните демонстрират средната стойност и стандартната грешка (n=5). \* $p < 0.05$  спрямо контролната група; & $p < 0.05$  спрямо фалшиво-оперираната група.



**Фигура 4.32.** Графично представяне на средния брой неврони при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните плъхове на 28 дни (Ахо – 28 дни) на ниво pons (А), pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (В) и colliculi superiores (Г). Хистограмите представят средната стойност и стандартната грешка (n=5). \* $p < 0.05$  спрямо контролната група; & $p < 0.05$  спрямо фалшиво-оперираната група.



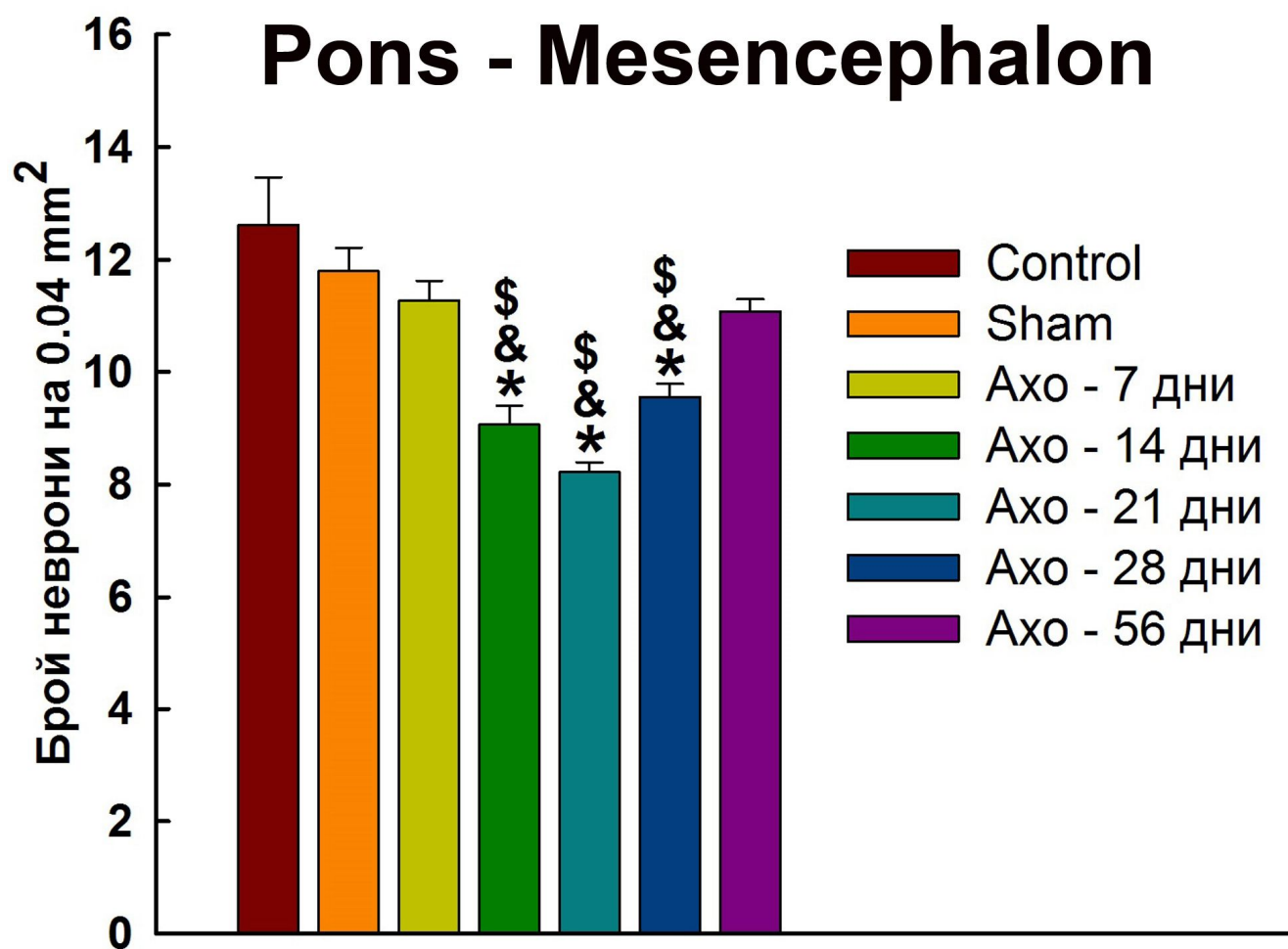
**Фигура 4.33.** Графично представяне на средния брой неврони на площ от 0.04 mm<sup>2</sup> при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните плъхове на 56 постоперативни дни (Ахо – 56 дни) на ниво pons (А), преходна зона pons-mesencephalon (Б), colliculi inferiores (В) и colliculi superiores (Г). Данните демонстрират средната стойност и стандартната грешка (n=5). \*p<0.05 спрямо контролната група.



**Фигура 4.34.** Статистическо представяне на средния брой неврони, на площ от 0.04 mm<sup>2</sup>, на ниво мост (*pons*) при контролната (*Control*), фалшиво-оперираната (*Sham*) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (*Ахо – 7 дни*), 14 дни (*Ахо – 14 дни*), 21 дни (*Ахо – 21 дни*), 28 дни (*Ахо – 28 дни*) и 56 дни (*Ахо – 56 дни*) след оперативната интервенция. Данните представят средната стойност и стандартната грешка ( $n=5$ ). \* $p<0.05$  спрямо контролната група; & $p<0.05$  спрямо фалшиво-оперираната група; § $p<0.05$  спрямо *Ахо – 7 дни*.

При сравнително разглеждане на средния брой неврони, на единица площ от 0.04 mm<sup>2</sup>, на ниво *pons* от контролната и фалшиво-оперираната групи, както и при аксотомираните животни през различни периоди, установихме следните зависимости (фиг. 4.34). Не регистрирахме статистически значими различия ( $p=0.062$ ) в средния брой неврони между контролната  $16.393\pm 0.403$  и фалшиво оперираната група  $15.308\pm 0.399$ . Средният брой неврони на единица площ на ниво *pons* намаляваше статистически значимо от  $16.393\pm 0.403$  при контролната група, на  $14.920\pm 0.443$  при *Ахо – 7 дни*,  $13.200\pm 0.416$  при *Ахо – 14 дни*,

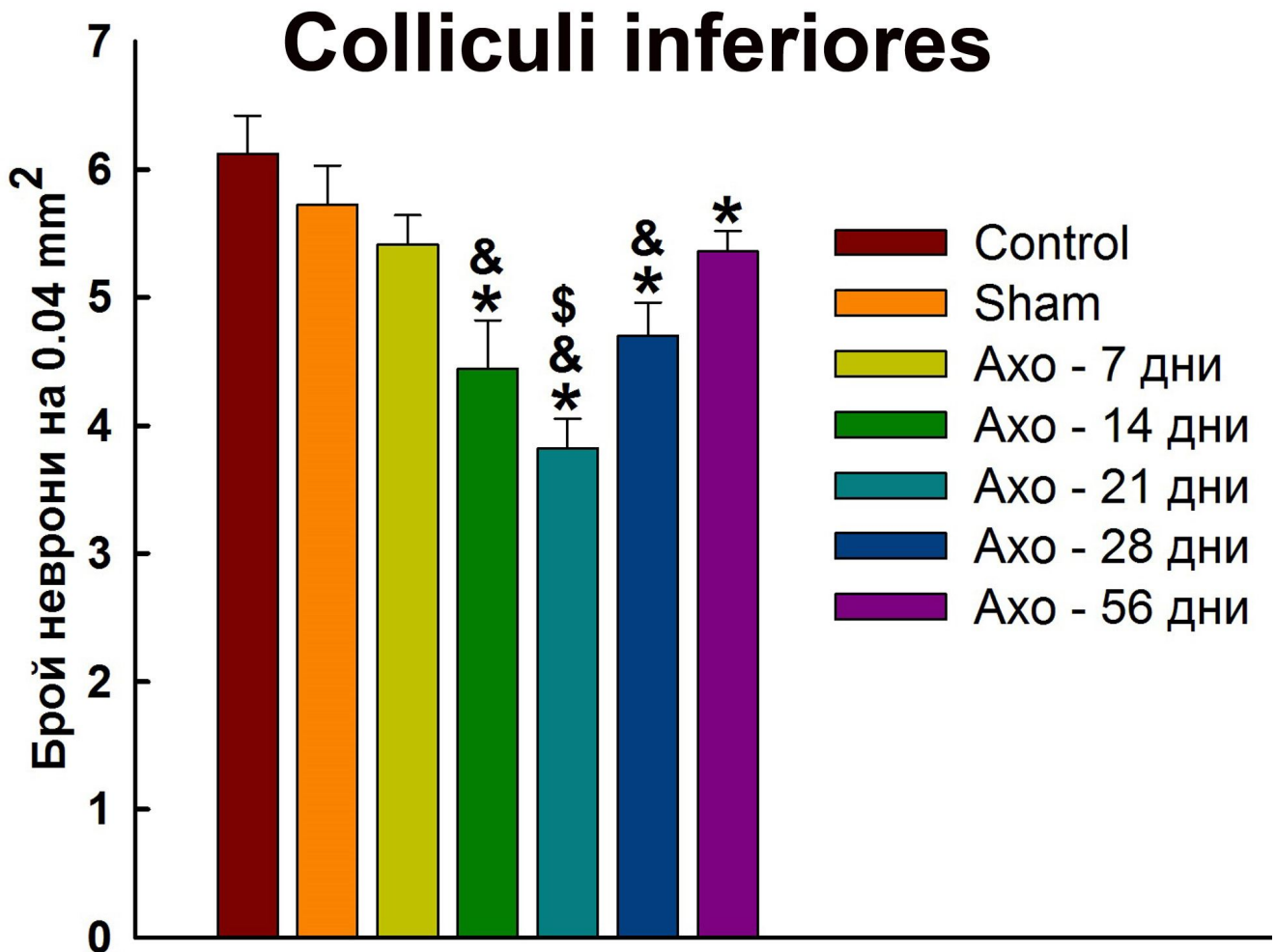
11.923±0.265 при Ахо – 21 дни и започваше плавно да се увеличава на 13.333±0.362 при Ахо – 28 дни и 14.710±0.369 при Ахо – 56 дни.



**Фигура 4.35.** Графично визуализиране на средния брой неврони на площ от 0.04 mm<sup>2</sup> на ниво преходна зона мост-среден мозък (pons-mesencephalon) при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни) след интервенцията. Данните отразяват средната стойност и стандартната грешка (n=5). \*p<0.05 спрямо контролната група; &p<0.05 спрямо фалшиво-оперираната група; §p<0.05 спрямо Ахо – 7 дни.

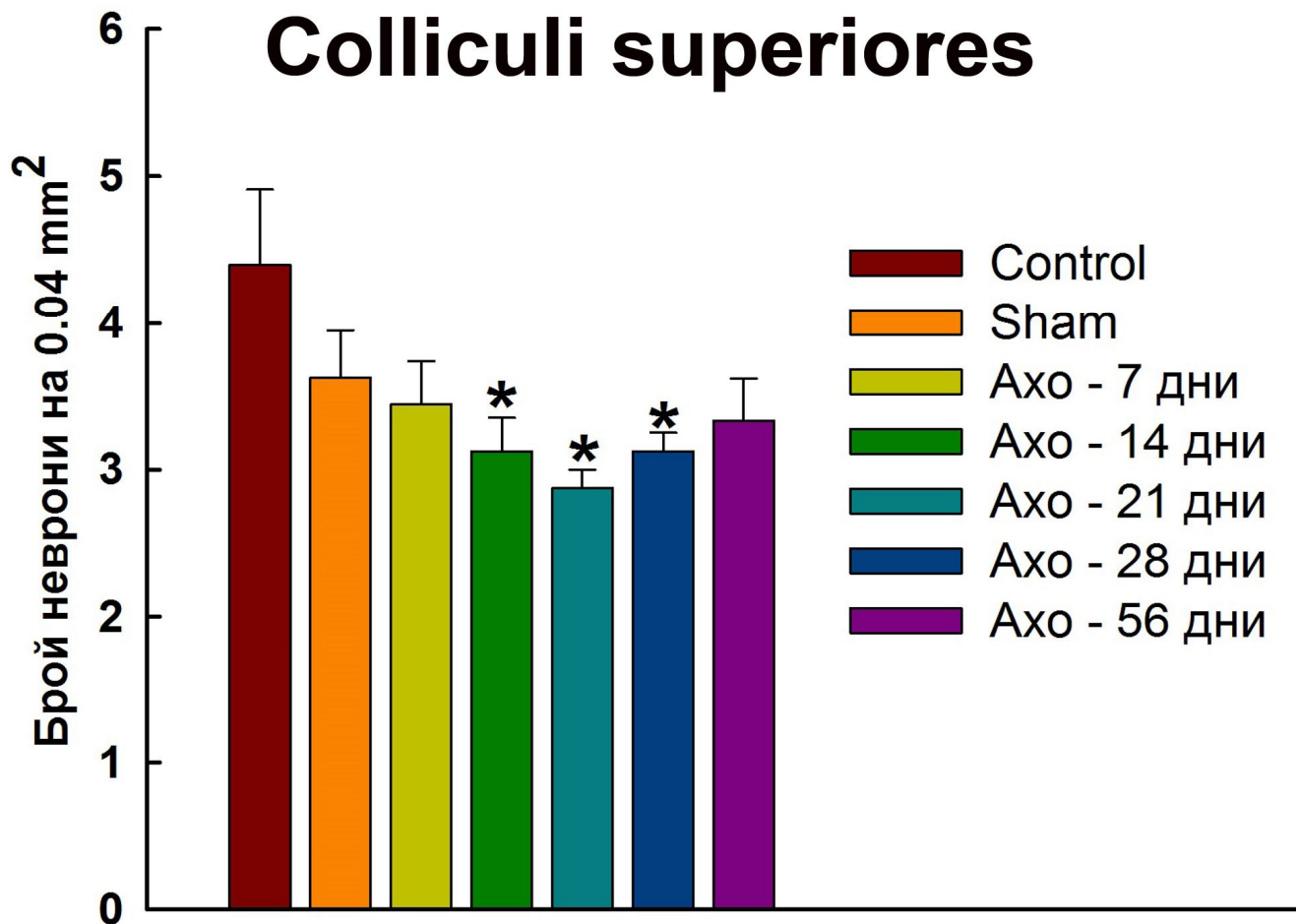
На ниво *pons-mesencephalon* средният брой неврони намаляваше статистически значимо (p<0.05) от 12.615±0.851 и 11.800±0.416 съответно при контролната и фалшиво-оперираната група на 9.063±0.335 при Ахо – 14 дни, 8.222±0.173 при Ахо – 21 дни, и започваше да се покачва на 9.550±0.235 при Ахо – 28 дни (фиг. 4.35). При аксотомираните животни на 56 дни получавахме средна стойност

11.091±0.211, като тази стойност не бе статистически значима ( $p>0.05$ ), както спрямо контролната, така и спрямо фалшиво-оперираната група. При 14-, 21- и 28-дневни аксотомирани плъхове броят на невроните в Me5 в преходната зона бе значително намален, като тази разлика бе статистически значима спрямо Ахо – 7 дни (фиг. 4.35).



**Фигура 4.36.** Статистическо изобразяване на средния брой неврони на площ 0.04 mm<sup>2</sup> на ниво colliculi inferiores при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни). Хистограмите илюстрират средната стойност и стандартната грешка ( $n=5$ ). \* $p<0.05$  спрямо контролната група; & $p<0.05$  спрямо фалшиво-оперираната група и \$ $p<0.05$  спрямо Ахо – 7 дни.

На ниво *colliculi inferiores* невроналната загуба беше статистически значима при 14- и 21-дневните аксотомирани плъхове и бе съответно  $4.444 \pm 0.377$  и  $3.824 \pm 0.231$  в сравнение със стойностите при контролната  $4.444 \pm 0.377$  и фалшиво-оперираната група  $5.727 \pm 0.304$ . При групите Ахо – 28 дни и Ахо – 56 дни, въпреки че наблюдавахме покачване в броя на невроните съответно на  $4.700 \pm 0.260$  и  $5.357 \pm 0.169$  отново разликата беше статистически значима спрямо контролната група, а при Ахо – 28 дни и спрямо Sham-групата (фиг. 4.36).



**Фигура 4.37.** Графично илюстриране на средния брой неврони на площ от  $0.04 \text{ mm}^2$  на ниво *colliculi superiores* при контролната (Control), фалшиво-оперираната (Sham) и аксотомираните групи съответно на 7 дни (Ахо – 7 дни), 14 дни (Ахо – 14 дни), 21 дни (Ахо – 21 дни), 28 дни (Ахо – 28 дни) и 56 дни (Ахо – 56 дни) след интервенцията. Данните изобразяват средната стойност и стандартната грешка ( $n=5$ ). \* $p < 0.05$  спрямо контролната група.

Още по рострално на ниво *colliculi superiores* средният брой неврони намаляваше статистически значимо ( $p < 0.05$ ) от  $4.000 \pm 0.510$  при контролната група на  $3.125 \pm 0.227$  при Ахо – 14 дни,  $2.875 \pm 0.125$  при Ахо – 21 дни и  $3.125 \pm 0.125$  при Ахо – 28 дни (фиг. 4.37).

## V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

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

### 5.1 Структурна пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони

Резултатите от нашето изследване показват че едностранното прекъсване на периферен нерв, *n. massetericus*, предизвиква развитието на забележими морфологични промени в клетъчните тела и израстъците на увредените мезенцефални тригеминални неврони. Те се манифестират основно с хроматолиза и трансневронална дегенерация на засегнатите перикариони, но също така и с дегенерационни промени в дисталните участъци на прекъснатия периферен нерв. Тази дегенерация е относително ранна клетъчна реакция, тя се визуализира като начален признак на морфологична увреда, далеч преди да се регистрира клетъчна загуба, но впоследствие като краен резултат може да доведе до значителна невронална загуба. Последната лесно може да бъде визуализирана на основата на наблюдаваните очевидни промени в ядръцето, които са следствие от периферната нервна лезия. Тези промени са полезен маркер за различаване на преживелите неврони и, по тази причина, броенето на ядръцата у аксотомираните и интактни неврони може да служи за надежден метод за сравнение и разпознаване на преживели и загинали нервни клетки в нормалните и

експериментални животни (Raappana and Arvidsson, 1992). Нашите данни потвърждават първоначалните анатомични находки в ядрото, които засвидетелстват че лезиите на Me5 или мезенцефалния тригеминален тракт причиняват дегенерация на влакната на нервите, инервиращи дъвкательните мускули и показват как тези лезии водят до хроматолиза на мезенцефалните тригеминални неврони (Allen, 1919; Corbin, 1940; Szentágothai, 1948; Dault and Smith, 1969). Тази морфологична констатация се подкрепя и от ранни ултраструктурни изследвания демонстриращи наличие на индуцирани от аксотомията дегенериращи и некротични Me5 неврони (Imamoto, 1972). Впоследствие по-нови изследвания потвърждават, че мезенцефалните тригеминални неврони са твърде чувствителни на периферна нервна увреда, и развиват дегенеративна аргирофилия, която води до забележима клетъчна смърт (Raappana and Arvidsson, 1992; Ichikawa et al., 2007). Подобни промени са установени в тригеминалните ганглийни клетки у плъх след прекъсване на *n. infraorbitalis* скоро след интервенцията и се афишират с ретроградна дегенерация на техните клетъчни тела, наречена трансганглионарна дегенерация (Aldskogius and Arvidsson, 1978).

Предишно количествено изследване на Me5 у плъх демонстрира, че периферната аксотомия на *n. massetericus* причинява известна (10.5-22.7%) редукция в броя на увредените мезенцефални тригеминални неврони и че повечето от тях загиват в периода между 10-ти и 30-ти постоперативен ден (Raappana and Arvidsson, 1992). Нашите морфометрични изследвания показват подобна тенденция и доказват че тя е общовалидна за цялото rostroкаудално протежение на ядрото. Данните от преброяването на отделните сегменти на Me5 – мостова част, преходна зона между мост и среден мозък, на ниво *colliculus inferior* и ниво *colliculus superior* в средния мозък подчертават безспорната констатация, че броят на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони, сравнени с този на невроните на интактната страна и при лъжливо оперираните експериментални животни, започва да намалява 7 дни след оперативната интервенция и продължава плавно да се снижава до края на третата седмица след нея. Това снижение в броя на увредените Me5 неврони е статистически значимо за всеки Me5 сегмент в рамките на този времеви диапазон. В края на първия месец след периферната аксотомия се забелязва тенденция на сметлинномикроскопска визуализация на сравнително по-голям брой на мезенцефални тригеминални неврони на страната на увредата, но те все още са по-малко, отколкото са регистрираните на този етап неврони в контролните

животни. В края на втория месец след експерименталното прекъсване на периферния нерв броят на наблюдаваните преживели неврони се доближава до този, регистриран в края на първата постоперативна седмица. Този феномен без съмнение се дължи не на възстановяване (чрез регенерация) на броя на аксотомираните мезенцефални неврони, а на факта, че те по всяка вероятност не могат да бъдат визуализирани с методите, приложени в това изследване.

Добре известно е като основен постулат в невробиологията, че нервните клетки заплащат своята висока специализация със загуба на способността си за постнатално делене. Независимо че през настоящия век се натрупаха достатъчно убедителни доказателства за разколебаване на тази догма, поне в отделни зони като *hippocampus* и *bulbus olfactorius* на крайния мозък у гризачи и примати (наскоро обобщени в Lepousez et al., 2015), преки доказателства на адултна невrogenеза в тази мозъчна област, все още не са приведени. Логично обяснение на феномена за визуализация на по-голям брой неврони в края на втория месец след аксотомията, можем да намерим във факта, че след първата седмица, последваща оперативната интервенция, мезенцефалните тригеминални неврони показват очевидни признаци на невронална дегенерация. Те включват на първо място дезинтеграция на гранулирания EP (електронномикроскопски еквивалент на Нисловите грануляции), която резултира в загуба на тинкториалните способности на цитоплазмата за оцветяване с крезил виолет по метода на Nissl, който се използва широко от изследователите за изследване на морфологията и хистопатологията на нервната тъкан. Очевидно е, че през периода между втора и четвърта седмица след периферната аксотомия част от увредените мезенцефални тригеминални неврони не могат да се визуализират с този метод и да бъдат наблюдавани под светлинен микроскоп. След задействане на защитните механизми в засегнатите неврони през втория месец след увредата на периферните им израстъци, те постепенно възстановяват поне една част от гранулирания EP и техните присъщи способности за активен протеинов синтез. Следователно те могат отново да бъдат оцветени с приложения оцветителен метод и да бъдат визуализирани с конвенционални хистологични и имунохистохимични методи. Наблюдаваните от нас промени подкрепят констатацията на Raappana и Arvidsson (1992), че пикът на невронална загуба е между втора и четвърта постоперативна седмица. В подкрепа на това предположение може да се отчете и факта, че времевият период на най-голяма невронална загуба хронологично съвпада с времето, когато се проявяват най-значителните промени в нивото на невроактивните вещества, експресирани от

аксотомираните Me5 неврони (Umamoto et al., 1994; Yoshida et al., 1995; Lazarov et al., 1999; Lazarov and Dandov, 2000). Тези данни ни дават основание да заключим, че процесът на адаптация към променените околни условия се съпровожда със значима клетъчна загуба. В този смисъл твърде вероятно е аксонални сигнали, индуцирани от нервната увреда да активират някои сигнални пътища на гени в невроналните клетъчни тела, които биха могли да доведат до първата от двете възможни противоположни последици – клетъчна смърт или регенераторен отговор на увредените неврони, водещ до тяхното преживяване. От друга страна в предишни изследвания са приведени убедителни доказателства, че периферната нервна увреда „принуждава” преживелите мезенцефални тригеминални неврони да модифицират своята обичайна активност като я превключат от състояние на поддържане на нормалните клетъчни функции и невротрансмисия към необичайни адаптационни феномени като регенерация и преживяване (Lazarov, 2007; Dandov et al., 2016). Има данни също така, че промените, индуцирани от нервната увреда включват и повишени невротрофни изисквания (Ichikawa et al., 2007).

## **5.2 Неврохимична пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони**

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

Нашите настоящи резултати показват забележителна химична пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони, която се проявява като разнопосочна (в насока свръхекспресия или снижение) промяна в нивото на основни трансмитери в Me5, доказано действащи при нормални условия, както и чрез новосинтезиране на определени невропептиди в условията на аксотомия. Данните от редица

изследвания са показали недвусмислено, че някои невротрансмитери и невропептиди не само опосредстват краткосрочното транссинаптично предаване на информацията, но могат да действат и като дългосрочни морфогенетични сигнали и трофични фактори, които подпомагат невроналния растеж, пластичност и преживяване (Lipton and Kater, 1989; Copray and Liem, 1993).

Изследването на невротрансмитерната пластичност на първичните сетивни неврони бележи своя пик в края на миналото столетие, когато редица изследователски групи посвещават значителни усилия в проучвания на този феномен в различни животински видове. Данните от редица имунохистохимични и хибридохистохимични изследвания са разкрили промените в нивото на експресирани от нервните клетки при нормални условия невронални калций-свързващи протеини и газови трансмитери след прерязване на периферен нерв (Arvidsson et al., 1994; Umemoto et al., 1994; Yoshida et al., 1995; Wakisaka et al., 1996; Larsen et al., 1997; De Gandarias et al., 1999). В нашето проучване, ние за пръв път установяваме понижен имунореактивитет (намален брой на имунопозитивни неврони и снижен интензитет на имунооцветяване) на глутамат в аксотомирани Me5 неврони. Предишни изследвания недвусмислено са показали, че тази възбудна аминокиселина е основен кандидат за невротрансмитер в мезенцефалните тригеминални неврони на плъх (Coprav et al., 1990b), морско свинче (Chandler, 1989) и котка (Lazarov, 2000; Lazarov and Dandov, 2000). Резонно обяснение на наблюдаваната от нас понижена експресия на глутамат бихме могли да намерим в посоченото по-горе функционално обстоятелство че периферната нервна увреда предизвиква пренасочване активността на увредените неврони от невротрансмисия към преживяване и регенерация на техните израстъци. В този смисъл логично е да се приеме, че нивото на невротрансмитерите, играещи главна роля при предаване на нервните сигнали между невроните при нормални условия, видимо се снижава при промяна в околната среда когато усилията на увредените неврони се насочват към тяхното оцеляване чрез минимизиране на обичайните им дейности. Това заключение би могло да се екстраполира и за други, изследвани в настоящето проучване атипични трансмитери като газовата молекула азотен оксид, за които има достатъчно данни, вкл. от предишни наши изследвания, че се експресират от мезенцефалните тригеминални неврони при обичайни околни условия (Lazarov and Dandov, 1998; Stoyanova and Lazarov, 2005a). В потвърждение и допълнение на това, 4-6 дни след прерязване на *n. infraorbitalis* е установено увеличение в броя на NADPH-диафороза-съдържащите мезенцефални тригеминални неврони

(De Gandarias et al., 1999). Подобни данни са получени и след прилагане на едностранна периферна аксотомия на *n. massetericus* у плъх – три дни след интервенцията мезенцефалните тригеминални неврони показват NADPH-диафороза-позитивност, достигайки максимален брой на реактивни Me5 неврони на 7-ия ден след аксотомията и поддържайки този висок брой до 8-ма постоперативна седмица, докато максималният брой индуцирани от аксотомията NOS-имунореактивни неврони се запазва до две седмици след интервенцията и в рамките на четири седмици след нея нитрергичните неврони отново изчезват (Varathan et al., 2001). Нашите резултати напълно подкрепят тази тенденция на ранно (в рамките на една седмица след периферната аксотомия) увеличаване броя на NADPH-диафороза-реактивните мезенцефални тригеминални неврони, персистиране на нитрергичните неврони до края първия месец след интервенцията и бавното им връщане към интактното състояние до края на втори постоперативен месец. Този феномен би могъл да се обясни с предположението, че постоянно повишеното ниво на NOS в Me5 неврони се дължи на бавно прогресиращата невронална клетъчна смърт след периферната нервна увреда, тъй като тя е логичен изход от засилената чувствителност на невроните към калций-медирана невротоксичност при неблагоприятните околни условия. Алтернативно, бихме могли да спекулираме че възможната ендогенна продукция на азотен оксид е в основата на защитен механизъм на невроните срещу нервната увреда и по такъв начин да се подпомогне преживяването и регенерацията на мезенцефалните тригеминални неврони.

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

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

От друга страна, резултатите от настоящето проучване недвусмислено разкриват, че мезенцефалните тригеминални неврони, които обичайно в нормални условия не синтезират невропептиди, като следствие от периферна нервна аксотомия започват да експресират други невропептиди на иРНК и протеинно ниво, които функционално са приети за инхибитори на сетивната трансмисия. Това се отнася както до участие в този процес на невроните, преимуществено ограничени в мостовата част на Me5, които инервират периодонталната връзка и са приети за пресорецептори, така и до тези, разпръснати из цялото ядро, които са свързани с инервацията на дъвкателната мускулатура. Нашите данни показват, че прерязването на периферен нерв индуцира имунореактивност към NPY, GAL и VIP в мезенцефалните тригеминални неврони у плъх една седмица след аксотомията и тази експресия достига максимален интензитет две седмици след травмата. Тези и предишни наши резултати (Dandov et al., 2005, 2010) допълват данните на други автори (Umemoto et al., 1994), които установяват експресия за VIP в увредените Me5 неврони на иРНК, но не и на протеинно ниво, както подкрепят и находките от последващи експерименти на Larsen и сътр. (1997), които демонстрират ранна експресия в аксотомирани мезенцефални тригеминални неврони на друг пептид от семейството на VIP – PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), при това в коекзистенция с NPY и GAL. Подобна травматично предизвикана невропептидна експресия е демонстрирана хронологично и в аксотомирани спинални ганглийни неврони у плъх (Noguchi et al., 1993). Авторите подчертават, че имунореактивни са големите по размери спинални ганглийни клетки, които функционално се приемат за проприоцептивни. Установеният от нас времеви

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

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

Добре известен факт в синаптологията е, че освобождаването на трансмитера от аксоналното окончание в синапса трябва да се компенсира от неговата *de novo* синтеза в перикариона му (Navarro et al., 2007). Ето защо, логично е да се приеме, че невропептиди като SP, които нормално участват в сетивната трансмисия се потискат при селективна аксотомия, докато експресията на пептидите, които служат като трофични фактори, се индуцира от аксотомия и те участват активно в ответния отговор към увреда и в процеса на невронална регенерация (Nielsch and Keen, 1989). Изглежда вероятно супресията на сетивната сигнална трансмисия и down-регулацията на възбудните невротрансмитери да е насочена към минимизиране на ефекта на периферна нервна увреда. Ние считаме освен това, че новосинтезираните невропептиди биха могли да играят и поддържаща роля в адаптивния процес като своеобразни невротрофни фактори, продуцирани в отговор на увредата, като по такъв начин те протектират аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони. Без съмнение, същинските невротрофини

като растежни фактори са включени в регулацията и поддръжката на фенотипа и морфофункционално състояние в зряла възраст. В подкрепа на това предположение е безспорно установеното им наличие в над 60% от мезенцефалните тригеминални неврони у възрастен плъх (Jacobs and Miller, 1999), което подсказва твърде вероятното им участие в процеса на преживяване на мезенцефалните тригеминални неврони. Понастоящем е известно, че допълнителното ендогенно прилагане на невротрофини може да усилва регенераторния отговор на периферно аксотомирани неврони (Navarro et al., 2007), но тяхната конкретна роля в този процес в Me5 предстои да бъде изследвана в бъдеще.

Индуцираните от аксотомията неврохимични изменения включват променен Me5 профил и на изследваните от нас невронални калций-свързващи протеини. Тази промяна е свързана основно с нивото на парвалбумин, и в по-малка степен, това на калбиндин. След латентен период от няколко дни, адаптационният отговор на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони включва забележимо понижение в нивото на парвалбумин, и по-слабо снижение на калбиндин. Липсата на промяна в началните дни би могла да се обясни с факта, че е нужно известно време след увредата за да може настъпилите промени да надхвърлят прага за тяхното имунохистохимично регистриране. От края на първата седмица тяхното ниво продължава да спада в сравнение с интактните мезенцефални тригеминални неврони и през втората постоперативна седмица то е забележимо по-ниско спрямо нивото им в Me5 неврони в контролната група. Тези данни са в съгласие с резултатите от предишни изследвания на ефекта на периферна аксотомия върху нивото на калций-свързващите протеини в Me5 у плъх (Wakisaka et al., 1996), и съвпадат с описаните първоначални промени в аксотомираните Me5 неврони и у други животински видове (Lazarov, 2000, 2007). При котка обаче нивото на тези калций-свързващи протеини се запазва непроменено през първата седмица след аксотомията и се понижават видимо едва през втората постоперативна седмица (Lazarov et al., 1998). Подобни промени обаче не са установени в невроните на спиналните ганглии след прерязване на периферни соматични или увреда на висцерални нерви (Honda, 1995; Medici and Shortland, 2015) По всяка вероятност, тези несъответствия се дължат на междувидови различия, но има и някои спекулации, потвърдени от предварителни експериментални данни (Raappana and Arvidsson, 1992), че *n. massetericus* е по-уязвим на увреда в сравнение с *n. alveolaris inferior*, който нерв върви през калцифицирана тъкан в костен канал.

Дискусионните интерпретации повдигат резонния въпрос дали установените от нас неврохимични промени са пряко следствие на намаление в броя на Me5 неврони, експресиращи тези протеини и/или се дължи на намален интензитет на тяхното имунооцветяване след периферната аксотомия. Изхождайки от демонстрираните от нас морфологични промени, можем да заключим, че и двата механизма допринасят за този феномен. Функционалната интерпретация на набелязаните неврохимични промени изисква обаче друг подход. Тъй като и двата изследвани калций-свързващи протеини са локализирани в големи по размери първични сетивни неврони, една субпопулация с известно високо калциево съдържимо, изглежда логично да предположим че тези протеини играят роля в буфериране на вътреклетъчния калций, както допуска Blaustein (1988). Налице са също така доказателства, че калций-свързващите протеини могат да функционират като вътреклетъчни калциеви транспортери или като буферираща система за клетъчна протекция на невроналната активност при нормални условия (Vaimbridge et al., 1982; Celio, 1990). Така например, Wakisaka и др. (1996a) допускат че калбиндин е включен в калций-буфериращите механизми в сетивните ганглий след периферна увреда. Нещо повече, неговото включване в този процес се съпровожда с поява на NPY-имунореактивност в тригеминалните първични аферентни неврони, където калциевата регулация е от особено значение (Sasaki et al., 1994). В тази връзка Wakisaka и сътр. (1996a) установяват частична коекзистенция между калбиндин и NPY в тригеминални ганглийни клетки у плъх, където и двете невроактивни вещества участват в буферни механизми за калциеви йони в увредените първични сетивни неврони. Сходна функционална интерпретация на подобни находки са направени от същия изследователски екип в друго изследване върху Me5 (Wakisaka et al., 1996b). Генералният извод, който бихме направили от анализа на горепосочените данни е, че промените в експресията на калций-свързващите протеини могат да бъдат отнесени към постигане на адекватен клетъчен отговор, тъй като чувствителността на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони към вътреклетъчната калциева концентрация изглежда се различава от тази на интактните Me5 неврони. В крайна сметка, може да се приеме че намалените нива на калций-свързващи протеини, наред с новосинтезирания NPY допринасят за преживяването на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони в процеса на адаптация след периферна аксотомия.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БЪДЕЩИ НАСОКИ

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

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

Морфофункционалните и неврохимични промени илюстрират удивителната интерактивна природа и забележителната, неподозирана досега, невронална пластичност на мезенцефалните тригеминални неврони. Промененият им след периферна нервна аксотомия и регистрираният по подходящ начин фенотип може да намери частично обяснение в уникалната им ектопична мозъчна локализация и функционалната им роля в проприцептивната сетивност на устно-лицевата област. Изглежда твърде вероятно това необичайно разположение на клетъчните тела на мезенцефалните тригеминални неврони в ЦНС да е от значение за адекватната им реакция на периферна нервна увреда, както са предположили Raappana и Arvidsson (1992).

## VII. ИЗВОДИ

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

1. Невроналната популация в мезенцефалното тригеминално ядро у плъх е силно чувствителна на периферна нервна увреда и показва ясно изразена структурна и неврохимична пластичност.
2. Периферната аксотомия предизвиква динамични, с отложено начало и дългосрочно хронологично протичане морфологични промени и изменения в неврохимичния фенотип на увредените мезенцефални тригеминални неврони.
3. Адаптационните морфологични феномени включват количествена и качествена структурна промяна на аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони.
4. Количествените изменения се изразяват в забележима и статистически значима невронална загуба на страната на увреждането в сравнение с броя на невроните в интактната страна на ядрото.
5. Качествените промени в Me5, предизвикани от периферното нервно прерязване се проявяват с трансневронална дегенерация и хроматолиза на перикарионите на аксотомираните неврони, и дегенерация на техните периферни израстъци.
6. Индуцираните от аксотомията промени в неврохимичния фенотип се изразяват в понижена активност (down-regulation) на нормално експресиращите се в ядрото класически трансмитери (глутамат) и невронални калций-свързващи протеини (парвалбумин и калбиндин), повишена активност (up-regulation) на газовия трансмитер азотен оксид, и *de novo* синтеза на някои невроактивни пептиди (NPY, GAL и VIP) от увредените мезенцефални тригеминални неврони.
7. Новосинтезираните протеини участват в орофациалната проприоцепция само в необичайно променени условия на околната среда. По всяка вероятност те подтискат на пресинаптично ниво трансмисията на абнормално променените в резултат на периферната нервна увреда неврони.

8. В хронологичен порядък установените морфологични и неврохимични промени в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони се манифестират в края на първата постоперативна седмица, персистират до края на четвъртата седмица и бавно започват да отшумяват за да се върнат до обичайното си състояние и ниво в тях към края осма седмица след оперативната интервенция.
9. Морфологичните промени в аксотомираните мезенцефални тригеминални неврони са важно тяхно адаптивно свойство, насочено към преживяването им в условията на променена околна среда. Неврохимичните промени са друг релевантен фактор за преживяването на аксотомираните мезенцефални неврони и също допринасят за регенерацията на техните аксони в хода на адаптационния процес.

## **VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ**

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

6. Мезенцефалното тригеминално ядро у плъх показва признаци на забележителна структурна и неврохимична пластичност на неговата невронална популация, качество присъщо на всички първични сетивни неврони.

### **ПОТВЪРДИТЕЛНИ ПРИНОСИ**

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

### **IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. **Dandov A**, Draganov M, Lazarov N (2005) Synthesis of galanin and neuropeptide Y in the rat mesencephalic trigeminal nucleus after injury of n. massetericus. *Trakia Journal of Sciences* **3**: 1–5.
2. **Dandov A**, Penkova Zh, Lazarov N (2010) *De novo* expression of neuropeptides in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after masseteric nerve injury. *Acta morphologica et anthropologica* **15**: 27–30.
3. **Dandov AD**, Atanasova DY, Lazarov NE (2016) Morphological changes in the rat mesencephalic trigeminal nucleus following peripheral axotomy. *Comptes Rendus de l'Académie bulgare des Sciences* **69**: 801–806. **IF2015: 0.233**

## Х. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

## XI. SUMMARY

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

## БЛАГОДАРНОСТИ

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

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

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

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

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

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

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

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

