

МОРФОМЕТРИЈСКА И СТЕРЕОЛОШКА АНАЛИЗА ГАНГЛИЈСКИХ СТРУКТУРА МИЈЕНТЕРИЧКОГ НЕРВНОГ СПЛЕТА ЗАВРШНОГ ДЕЛА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА КОД ЧОВЕКА

Мандић П.¹, Филиповић Т.¹, Букић Н.¹ Недељковић В.²

¹Институт за анатомију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за патолошку анатомију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

MORPHOMETRIC AND STEREOLOGICAL ANALYSIS GANGLION STRUCTURES OF MYENTERIC NERVE PLEXUS, TERMINALLY PART OF HUMAN LARGE INTESTINE

Мандић П.¹, Филиповић Т.¹, Букић Н.¹ Недељковић В.²

¹Institute of anatomy, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

²Institute of pathological anatomy, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Myenteric nervous plexus is from rare importance for function of gastrointestinal tract. It perform one regulatory level autonomic nervous system which is situated within wall of digestive tract wherefore is directly exposed effect pathogenetic factors from extern ambience. Aim of these study is that itself within terminal part of large intestine (sigmoid colon and rectum) particularly inquest myentric nervous plexus as part of autonomic nervous system. That itself describe shape and arrangement of ganglion structures, as well as, shape and arrangement of ganglion cells of myenteric nervous plexus. Within our researches we use totally 60 tissue samples of human sigmoid colon and rectum. From anterior wall those part of large intestine was taken 30 samples, also and same number of samples towards parts of posterior wall. Proximately past getting samples was determine their volume by using picnometre. Afterwards are made preparations coloured by He, Cresyl - violet and AgNO₃ methods. Tissue samples are sliced within step - shared series of incisions with thickness slice by 7µm and thickness grade by 50µm. Stereological analysis was perform by test system M42 which is calibrated on enlarge objective 40x. During analysis was determined absolute volume of ganglion structures of myenteric plexus and absolute number of ganglion cells inside of ganglion structures. Structures of myenteric nervous plexus being shown on longitudinal cross - section of tissues as flat, irregular ramify structure explicitly limited from surrounding smooth muscles. Immanent is upward trend absolute volume of ganglion structures and absolute number of ganglion cells goes from sigmoid colon according to ampullar part of rectum. Variance on level of significance by p<0,05 are present only if itself compare absolute volume of ganglion structures and absolute number of ganglion cells of myenteric plexus ampullar part of rectum and uppermost part of sigmoid colon. Test correlation shows of being presence high statistic significant (p<0,001) correlation between absolute volume of ganglions and absolute number of ganglion cells of myenteric nervous plexus.

Key words: myenteric nervous plexus; human large intestine; morphometric and stereological analysis

САЖЕТАК

Мијентерички нервни сплет је од изузетне важности за функционисање гастроинтестиналног тракта. Он представља један регулативни ниво аутономног нервног система који је смештен у самом зиду дигестивног тракта те је и директно изложен утицајима патогенетских фактора из спољашње средине. Циљ ове студије је да се у завршном делу дебелог црева (сигмоидни колон и ректум) детаљно проучи мијентерички нервни сплет као део аутономног нервног система. Да се опише облик и распоред ганглијских структура, као и облик и распоред ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета. У нашим истраживањима је коришћено укупно 60 узорака ткива људског сигмоидног колона и ректума. Са предњег зида ових делова дебелог црева узето је 30 узорака, а такође и исти број узорака наспрамних делова задњег зида. Непосредно после узимања узорака одређивана је њихова запремина помоћу пикнометра. Након тога су прављени препарати бојени HE, Cresyl-violet и AgNO₃ методом. Узорци ткива сечени су у степенасту серију резова са дебелином реза од 7µm и дебелином степена 50µm. Стереолошка анализа вршена је тестним системом M42 који је калибриран на увећању објектива 40x. У току анализе одређивана је апсолутна запремина ганглијских структура мијентеричког нервног сплета и апсолутни број ганглијских ћелија унутар ганглијске структуре. Структуре мијентеричког нервног сплета се на уздужним пресецима ткива показују као широке, неправилно разгранате структуре, јасно ограничене од околних глатких мишића. Присутна је тенденција пораста апсолутних запремина ганглијских структура и апсолутног броја ганглијских ћелија идући од сигмоидног колона према ампуларном делу ректума. Разлике на нивоу значајности p<0,05 присутне су једино ако се пореде апсолутна запремина ганглијских структура и апсолутни број ганглијских ћелија мијентеричког сплета ампуларног дела рек-

тума и најпроксималнијег дела сигмоидног колона. Тест корелације показује да је присутна висока статистички значајна ($p < 0,001$) корелација између апсолутне запремине ганглија и апсолутног броја ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета.

Кључне речи: мијентерички нервни сплет; дебело црево човека; морфометријска и стереолошка анализа

УВОД

Функција гастроинтестиналног система налази се под контролом аутономног нервног система. Симпатички и парасимпатички нерви у зиду црева сачињавају сложени ентерички нервни систем који се може сматрати посебним делом аутономног нервног система. Овај део нервног система функционише помоћу неуротрансмитера од којих поред ацетилхолина и норадреналина сусрећемо и серотонин, вазоактивни интестинални пептид, неуротензин и ангиотензин II. Нервни сплетови цревног зида су одговорни за перисталтичке контракције и координацију моторне активности глатке мускулатуре која не изостаје и при потпуном одсуству спољашње инервације. Ентерички нервни систем садржи више стотина милиона нервних ћелија и нервних влакана која су распоређена у 7 нервних сплетова (1). Три сплета садрже ганглијске ћелије и то су тзв. ганглионарни сплетови, док су четири сплета лишена присуства ганглијских ћелија и садрже само нервна влакна (аганглионарни сплетови). Ганглионарни ентерички сплетови су: унутрашњи подслузокожни сплет (*plexus submucosus internus* - Meissner), спољашњи подслузокожни сплет (*plexus submucosus externus* - Schabadasch) и мијентерички нервни сплет (*plexus myentericus* - Auerbach). Мијентерички нервни сплет је од изузетне важности за функционисање гастроинтестиналног тракта. Он представља један регулативни ниво аутономног нервног система који је смештен у самом зиду дигестивног тракта те је и директно изложен утицајима патогенетских фактора из спољашње средине (2, 3). Одликује се густом мрежом нервних влакана у коју су уткане многобројне ганглије обично груписане у нодусе или чворове. Мијентерички нервни сплет лежи у простору између лонгитудиналног и циркуларног слоја глатке мускулатуре зида дигестивне цеви. Облик, број и величина ганглија су детерминисани урастањем мијентеричког нервног сплета у међумишићни простор који заузима (4). Многе од мијентеричких ганглија су равне или неправилног сочивастиг облика и када се погледају, њихове површине су обично угласто оцртане у зависности од бројности и уређености мреже око њих. Влакна полазе од ганглија и често се може наћи мала дистанца између њих у мрежи. У дебелом цреву, мијентерички нервни сплет је по својој структури сличан сплету код осталих делова дигестивног тракта (5). У студијама где су коришћене методе ретроградног бојења у људском колону мијентерички неурони су показали да имају пројекцију изнад 68 mm дужине (6). Истраживања на људском колону (7) показују да ентерички неурони мијентеричког сплета могу бити карактерисани по њиховом хемијском коду, пројекцији и морфологији. Ректални део мијентеричког сплета је нарочито богат влакнима и ганглијама. На крају је испрекидан хоризонтално, унутрашњим

сфинктером, кога снабдева еферентним влакнима. Сматра се да ректум показује нешто већу неуроналну густину у односу на колон.

ЦИЉ РАДА

На основу проучених литературних података дошли смо до закључка да је мијентерички нервни сплет од изузетног значаја за функционисање система за варење. Стога је превасходни циљ овог истраживања да се у појединим деловима дебелог црева (сигмоидни колон и ректум) детаљно анализира мијентерички нервни сплет као део вегетативног нервног система. У том правцу обавиће се хистолошка анализа мијентеричког нервног сплета предњег и задњег зида ректума и сигмоидног колона. У оквиру ње сагледаће се: а) облик ганглијских структура мијентеричког нервног сплета ректума и сигмоидног колона; б) облик и распоред ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета; ц) распоред и дистрибуција нервних влакана мијентеричког нервног сплета ректума и завршног дела колона. Поред тога одређивана је апсолутна запремина ганглијских структура мијентеричког нервног сплета у узорцима ткива предњег и задњег зида ректума и сигмоидног колона као и апсолутни број ганглијских ћелија у њима. Наша основна хипотеза је да је у простору предњег и задњег зида ректума мијентерички нервни сплет квантитативно заступљенији у односу на сигмоидни колон. Хипотеза се заснива на специфичностима моторних функција ректума, поготово његовог ампуларног дела.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

У нашим истраживањима исечци ткива предњег и задњег зида сигмоидног колона и ректума узимани су са обдукцијског материјала Института за судску медицину Медицинског факултета у Београду. Исечци ткива величине 1x1 cm у издвајани су пажљиво цревним маказама и тупом страном скалпела од осталих околних структура. Са сваког места узета су два узорка ткива, са намером да се примене две технике хистолошког резања (попречно и тангенцијално). Поред тога систематизовани су и подаци о узроку смрти одређене особе. Узорци су узети са 6 кадавера, укупно 30 узорака предњег зида са 5 места и 30 узорака задњег зида са 5 места.

Апсолутна запремина ткивног узорка се одређивала помоћу пикнометра. Овај начин одређивања апсолутне запремине заснива се на принципу волумена истиснуте течности.

Након узимања материјала вршена је његова обрада на Институту за патолошку анатомију Медицинског факултета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици.

Извршена је класична хистолошка обрада материјала. Калупљење је вршено парафином, након чега

су ткивни узорци били резани на два начина: резovima управним на уздужну осовину црева (класично) и резovima паралелним са површином црева све до мијентеричког сплета и кроз њега. Хистолошки препарати су бојени рутинском методом са хематоксилином и еозином, а за сигурну идентификацију ганглијских структура и ћелија бојени су сребронитратом по методи Masson Fontana и Cresyl-violet бојом.

За стереолошку анализу коришћени су ткивни исечци код којих је пресек прављен паралелно са површином црева, а као контрола прављени су класични резovi. Узорци ткива сечени су у степеничасту серију резова са дебелином реза од 7 μm и дебелином степена 50 μm . Стереолошка анализа вршена је тестним системом М42 који је калибриран на адекватном повећању окулара и објектива. За мерење пречника ћелија коришћен је окуларни микрометар.

Основна морфо-стереолошка анализа вршена је на препаратима бојеним хематоксилин-еозином, а контрола на препаратима бојеним cresyl-violet и Fontana-Masson методом. За одређивање апсолутног броја ганглијских ћелија мијентеричког сплета коришћене су стандардне стереолошке методе и формуле (8, 9).

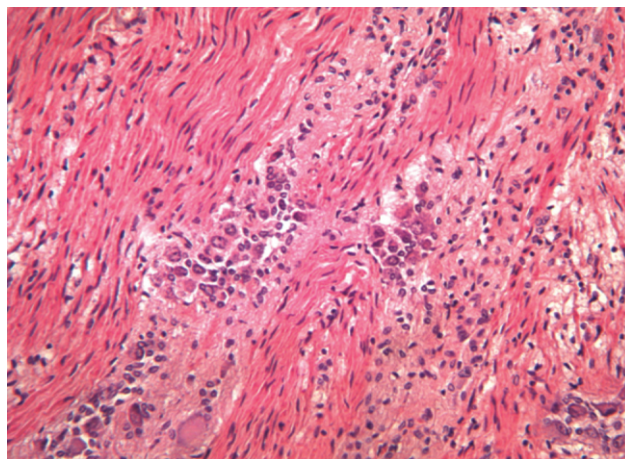
Добијени резултати обрађивани су статистичким методама. Коришћен је студент т тест и анализа варијансе као и тест корелације.

РЕЗУЛТАТИ РАДА

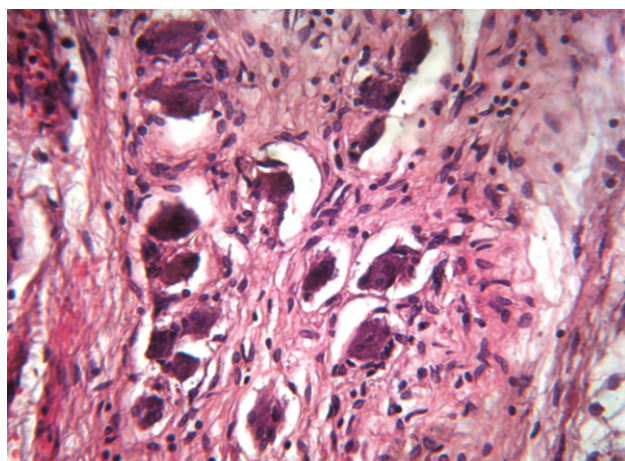
Пре стереолошке анализе и квантификације структура мијентеричког сплета извршена је детаљна хистолошка анализа свих структурних елемената. На попречним пресецима уочава се мијентерички нервни сплет који се налази између уздужног и кружног слоја глатке мускулатуре цревног зида. Ганглијске структуре су јасно ограничене од околине, најчешће су овалног облика, а садрже нервне продужетке, накупине ганглијских и глија ћелија. На уздужним пресецима који су прављени од серозе према слузокожи у виду степеничасте серије уочавају се ганглијске структуре различите величине и облика између неправилно разбацаних мишићних снопова. Мијентерички нервни сплет у предњем зиду ректума и сигмоидног колона показује се у виду широких поља неправилног облика и величине са разбацаним ганглијским ћелијама (слика 1), појединачним или у мањим групама. Ганглијске ћелије окружене су малим овалним једрима сателитских неуроглијалних ћелија, а између тих структура налазе се многобројна нервна влакна. Ганглијске структуре су међусобно повезане нервним влакнима, а до њих долазе и нервна влакна која се пробијају између мишићних снопова.

На већим повећањима (слика 2) ганглијске ћелије се показују као овалне, округле, полигонале или вретенасте. Једро је мехурасто са мало хроматина и увек присутним хиперхромним једарцетом, које је најчешће централно постављено. Једро је обично лако дислоцирано од центра ћелије, односно умерено ка једном делу ћелије.

У табели 1 приказане су просечне вредности апсолутног волумена свих испитиваних узорака на предњем и задњем сигмоидног колона и ректума. Уоч-



Слика 1. Ректум, уздужни пресек, ХЕ 200x



Слика 2. Ректум, уздужни пресек, ХЕ 400x

Табела 1. Апсолутна запремина ганглијских структура мијентеричког нервног сплета у узорцима ткива предњег и задњег зида сигмоидног колона и ректума човека изражена у mm^3 .

Узорци ткива		Сигмоидни колон			Ректум	
		1	2	3	4	5
Предњи зид	Х-бар	0.151	0.218	0.247	0.250	0.232
	СД	0.037	0.049	0.050	0.037	0.042
	СЕ	0.015*	0.018	0.014	0.015	0.021
Задњи зид	Х-бар	0.154	0.212	0.237	0.249	0.240
	СД	0.038	0.044	0.083	0.060	0.073
	СЕ	0.017*	0.018	0.034	0.024	0.037

* $p < 0.05$

љиво је да се просечне вредности апсолутних запремина крећу од $0,151 \pm 0,037 \text{ mm}^3$ у сигмоидном колону (узорак 1 предњег зида) до $0,250 \pm 0,037 \text{ mm}^3$ у ампуларном делу предњег зида ректума (узорак 4). На задњем зиду завршног дела дебелог црева вредности апсолутних запремина ганглијских структура крећу се од $0,154 \pm 0,038 \text{ mm}^3$ у сигмоидном колону (узорак 1) до $0,249 \pm 0,060 \text{ mm}^3$ у ампуларном делу ректума.

Приметно је да постоје одређене разлике у погледу просечних вредности апсолутног волумена ганглијских структура мијентеричког нервног сплета. Апсолутне запремине су највеће у простору ампуларног дела ректума и на предњем и на задњем зиду, а најмање у проксималном делу сигмоидног колона.

Добијене вредности тестиране су статистичким методом (анализа варијансе и Студент-т тест). Ови тестови су показали да се вредности апсолутног волумена ганглијских структура мијентеричког нервног сплета првог узорка (проксимални део сигмоидног колона) разликују у односу на вредности четвртог узорка (ампуларни део ректума на нивоу статистичке значајности $p < 0.05$).

Осим мерења апсолутних запремина ганглијских структура мијентеричког нервног сплета узорака ткива предњег и задњег зида сигмоидног колона и ректума одређивање је и апсолутни број ганглијских ћелија у њима. Просечне вредности апсолутног броја ганглијских ћелија приказане су у табели 2.

Табела 2. Апсолутни број ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета у узорцима ткива предњег зида ректума и сигмоидног колона човека.

Узорци ткива		Сигмоидни колон			Ректум	
		1	2	3	4	5
Предњи зид	Х-бар	2304	3933	4491	4536	4224
	СД	696.7	1172.2	1147.5	1144.2	1230.5
	СЕ	284.4*	450.1	450.1	467.1	584.0
Задњи зид	Х-бар	2403	3987	4319	4463	4114
	СД	569.8	1027.9	1074.2	1154.1	1131.5
	СЕ	248.1*	438.4	456.2	467.2	575.0

* $p < 0.05$

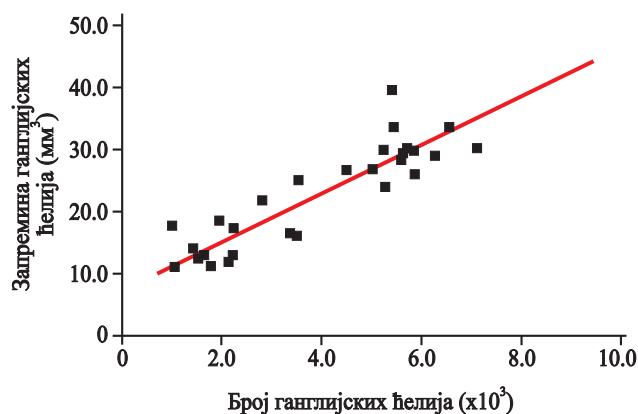
Из табеле се може уочити да се просечне вредности апсолутног броја ганглијских ћелија предњег зида крећу од $2304 \pm 696,7$ у сигмоидном колону (узорак 1) до $4536 \pm 1144,2$ у ампуларном делу ректума (узорак 4). На задњем зиду завршног дела дебелог црева вредности апсолутног броја ганглијских ћелија крећу се од $2403 \pm 569,8$ у сигмоидном колону (узорак 1) до $4463 \pm 1154,1$ у ампуларном делу ректума (узорак 4).

Добијени резултати указују на чињеницу да постоје одређене разлике у погледу просечних вредности апсолутног броја ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета. Апсолутни број ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета највећи је у ампуларном делу ректума, нешто нижи у дисталном делу ректума и дисталном делу сигмоидног колона, док долази до умереног пада њиховог броја у средњем и наглог пада у проксималном делу сигмоидног колона.

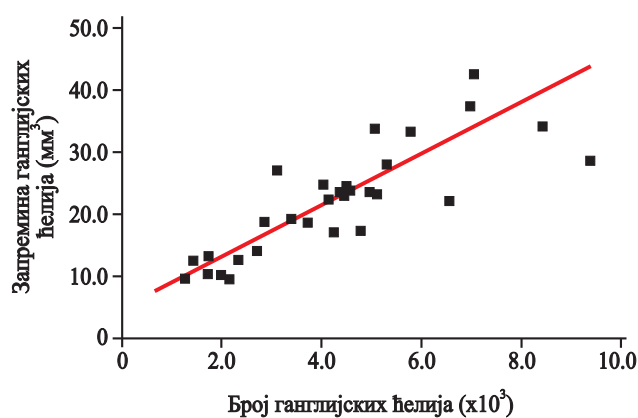
Добијене вредности тестиране су статистичким методом (анализа варијансе и Студент-т тест). Статистички тестови су показали да се вредност апсолутног броја ганглијских структура мијентеричког нервног сплета првог узорка (проксимални део сигмоидног ко-

лона) разликује у односу на вредности осталих узорака на нивоу статистичке значајности $p < 0.05$

Питање које се наметнуло јесте да ли одређену запремину ганглијских структура мијентеричког сплета сигмоидног колона и ректума човека увек прати одговарајући број ганглијских ћелија. Из тог разлога урадили смо тест корелације између апсолутне запремине ганглијских структура и броја ганглијских ћелија у предњем и задњем зиду поменутих делова дебелог црева. Добијени резултати илустровани су графикон. 1 и 2.



Графикон 1. Корелација између броја ганглијских ћелија и запремине ганглијских структура мијентеричког сплета предњег зида сигмоидног колона и ректума.



Графикон 2. Корелација између броја ганглијских ћелија и запремине ганглијских структура мијентеричког сплета задњег зида сигмоидног колона и ректума.

Графикони показују да су готово сви резултати апсолутних запремина ганглијских структура и апсолутног броја ганглијских ћелија груписани око једне праве, што доказује постојање врло високе корелације. Статистичким тестом дошли смо до сазнања да је корелација значајна на нивоу од $p < 0,001$, што говори о њеној екстремној сигнификантности.

ДИСКУСИЈА

У нашим истраживањима учинили смо најпре детаљну хистолошку анализу свих 60 узорака ткива предњег и задњег зида сигмоидног колона и ректума.

Посебна пажња усмерена је на ганглијске ћелије, њихов облик, дистрибуцију, да ли оне показују знаке патолошких измена и друго. Патолошке промене на цитоплазми и једру у смислу атрофије, акумулације липофусцинског пигмента, вакуоларно-грануларне дегенерације и других, које су присутне код неких обољења аутономног нервног система на нашем материјалу нису запажене. Наши узорци су стандардизовани одређивањем њихове запремине помоћу пикнометра на величину до 0,300 mm³. Можемо бити сигурни да су узорци ткива садржавали анатомски и хистолошки неизмењене мијентеричке сплетове. Приметно је да постоје одређене разлике у погледу просечних вредности апсолутног волумена ганглијских структура мијентеричког нервног сплета. Апсолутне запремине су највеће у простору ампуларног дела ректума и на предњем и на задњем зиду, а најмање у проксималном делу сигмоидног колона.

Исто тако апсолутни број ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета највећи је у ампуларном делу ректума, нешто нижи у дисталном делу ректума и дисталном делу сигмоидног колона, док долази до умереног пада њиховог броја у средњем и наглог пада у проксималном делу сигмоидног колона.

Питање које нам се само намеће је који су разлози постојања волуминознијег мијентеричког нервног сплета у ректалном у односу на сигмоидни сегмент дебелог црева човека. Највероватније образложење лежи у чињеници да ректум одликује присуство веома снажне глатке мускулатуре која је оспособљена да поднесе велике амплитуде наизменичне релаксације и веома јаке пропулзије (10, 11). Ректум у свом ампуларном делу складишти фекалне масе и у току акта дефекације снажним пропулзивним покретима обезбеђује њихово избацавање у спољашњу средину. Да би своју функцију нормално обављао овај дигестивни сегмент поседује добро развијену мускулатуру, а такође и ефикасну, развијену неуроналну контролу интензивних контракција, а после њих у току дужег временског периода интензивне релаксације.

ЗАКЉУЧАК

На основу наших хистолошких и стереолошких истраживања мијентеричког нервног сплета можемо извести неколико закључака.

Структуре мијентеричког нервног сплета (ганглиони) приказују се на попречним пресецима као овалне структуре, а на уздужним пресецима као широке, неправилно разгранате структуре, јасно ограничене од околних мишићних снопова.

Ганглијске ћелије мијентеричког нервног сплета су крупне, различитог облика (округле, овалне или полигоналне) еозинофилне цитоплазме са мехурас-

тим округлим једром са једним хиперхромним једарцем, разбацане су неправилно или груписане у мање групе.

Апсолутна запремина ганглијских структура мијентеричког нервног сплета највећа је у области предњег и задњег зида ректума и ректосигмоидног прелаза, а постепено опада идући ка проксималном делу сигмоидног колона.

Апсолутни број ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета показује највеће вредности у области предњег и задњег зида ректума и ректосигмоидног прелаза, а постепено опада идући ка проксималном делу сигмоидног колона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Milisavljević M.: *Klinička anatomija*, Nauka Beograd 1996.; 387-388.
2. Miura H., Ohi R., Iseng S.W., Takahashi T.: The structure of the transitional and aganglionic zones of Auerbach's plexus in patients with Hirschsprung's disease: a computer-assisted three-dimensional reconstruction study; *J. Pediatr. Surg.* 1996 Mar; 3 (3); 420-6
3. Meier-Ruge W.A., Brunner L. A., Engert J., Heminghaus M., Holschneider A.M., Jordan P., Picket G., Posselt H.G., Schärli A.: A correlative morphometric and clinical investigation of hypoganglionosis of the colon in children; *Eur. J. Pediatr. Surg.* 1999 Apr; Vol. 9 (2); 67-74
4. Hens J., Gojda M., Schenermann D.W., Adriaensen D., Timmermans J.P.: The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucosal neurons. *Histochem. Cell. Biol.* 2002 Jun; 117 (60); 481-92
5. Karaosmanoglu T., Aygun B., Wade P.R., Gershon M.D.: Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons; *Anat. Rec.* 1996 Apr; 244 (4); 470-80
6. Porter A.J., D.A. Wottchow, S.J.H. Brookes and M. Costa: Cholinergic and nitrergic interneurons in the myenteric plexus of the human colon; *Gut* 2002; 51 (1): 70-75
7. Porter A.J., Wottchow D.A., Brooks S.J., Costa M.: The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon; *Gastroenterology*, 1997 Dec; Vol 113 (6): 1916-23
8. Kališnik M.: *Temelji stereologije*; Ljubljana 1985.: 30-32
9. Gudović R., Matavulj M., Stefanović N., Lozanov-Crvenković Z.: *Osnovi stereologije (priručnik)*; Folia Anatomika, Volumen 21/22 Supplementum 2, Novi Sad 1994.: 8-10
10. Wallace A.S., Burns A.J.: Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract; *Cell. Tissue Res.* 2005 Mar; 319 (3): 367-82
11. Wallchow D.A., Brookes S.J., Costa M.: The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine; *Gastroenterology*. 1995 Sep; 109 (3): 866-75