

МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ГАНГЛИЈСКИХ СТРУКТУРА МИЈЕНТЕРИЧКОГ НЕРВНОГ СПЛЕТА ПРЕДЊЕГ ЗИДА ЖЕЛУЦА ЧОВЕКА У ТОКУ ПРОЦЕСА СТАРЕЊА

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 ANALYSIS GANGLIONIC STRUCTURES OF MYENTERIC NERVOUS PLEXUS FORE WALL OF HUMAN STOMACH DURING PROCESS OF AGING

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

¹Institute for anatomy, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

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

SUMMARY

Aging as continuous biological process, affect all organic systems. Aging is believed to affect the structure and function of the enteric nervous system. Primary aim these studies is to verify changes in number of neurons in myenteric nervous plexus of human stomach within relation to process of aging. In the course of research played is analysis number of neurons in myenteric nervous plexus of anterior wall stomach. Analysis was performed within 30 tissue samples which are classified into three age groups: (from 20 to 44 years, from 45 to 64 years and over 65 to 84 year old). Played is histological processing and stained with HE, Cresyl-violet, AgNO₃ and AChE methods. The morphometric measures operated by morphometric multipurpose test system M42. Finding results are statistically processed by Student-t-test and analysis of variance. Discernible is very heavy loss of neurons of myenteric plexus within the oldest group in relation to younger groups. Applied test show are having statistically notable variance between age groups. In percentage, the loss of neurons in the oldest group in relation to others was from 13,81% to 15,44%.

Key words: myenteric plexus; gaster; aging

САЖЕТАК

Старење као континуирани биолошки процес, захвата све органске системе. Старење се одражава и на структуру и функције ентеричког нервног система. Примарни циљ ове студије је да покаже промене у броју неурона мијентеричког нервног сплета желуца човека током процеса старења. У току истраживања вршена је анализа броја неурона у мијентеричком нервном сплету предњег зида желуца. Анализа је обављена на 30 узорака ткива који су разврстани у три старосне групе: (од 20 до 44 године, од 45 до 64 и од 65 до 84 године старости). Примењена је хистолошка обрада и бојења методама ХЕ, Крезил виолет, AgNO₃ и AchE. Морфометријска мерења су обављена морфометријским вишенаменским тестним системом М42. Добијени резултати су статистички обрађени Студент-Т тестом и анализом варијансе. Приметан је веома велики губитак неурона мијентеричког нервног сплета у најстаријој групи у односу на млађе. Примењени тестови показују постојање статистички значајне разлике између старосних група. Губитак неурона у најстаријој групи у односу на остале био је изражен у процентима од 13,81% до 15,44%.

Кључне речи: мијентерички сплет; желудац; старење

УВОД

Старење представља биолошки процес који захвата читав организам па на основу тога можемо претпоставити да оставља трага и на мијентеричком нервном сплету. У току старења ганглијске ћелије аутономног нервног система трпе одређене промене које су описане у бројним радовима на различитим деловима вегетативног нервног система (1, 2). Велики број радова указује да са старењем код људи постају учесталији поремећаји у функцији гастроинтестиналног тракта (3, 4,

5). Из великог броја радова може се видети да су бројни поремећаји мотилитета гастроинтестиналног тракта настали услед абнормалности ентеричког нервног система које су условљене старењем (6, 7, 8).

Gabella је још 1989. године показао да је број мијентеричких неурона код одраслог заморца за око једну трећину мањи у односу на младе заморце. Велики број аутора, у новије време је дошао до сличних резултата (9, 10.). У неким од радова установљено је постоја-

ње старосно зависног губитка холинергичке и нитрергичке колокализације у мијентеричком нервном сплету свиње (11). У досадашњим истраживањима на људском колону установљено је да се са старењем повећава број ганглија мијентеричког нервних сплета у којима се налази мањи број неурона у односу на ганглије млађих особа (12).

У нашем раду ми примењујемо нешто другачију, а донекле и мање сложену методологију за истраживање морфологије ганглија мијентеричког нервних сплета у ткиву попречног колона особа старости од 20 до 84 године.

ЦИЉ РАДА

Циљ овог истраживања је да се у желуцу човека детаљније испита мијентерички нервни сплет као део аутономног нервних система, применом адекватних хистолошких, морфометријских и стереолошких метода, које пружају могућност квантификације присутних индивидуалних разлика и верификације одређених евентуалних промена у структури мијентеричког нервних сплета у односу на старост.

У том циљу одређивање се број ганглијских ћелија на јединицу површине у ганглијским структурама мијентеричког нервних сплета предњег зида желуца. Такође, одредиће се и површина ареала ганглијских структура мијентеричког нервних сплета у узорцима ткива предњег зида желуца човека. Одређивање се и део површине ареала ганглијских структура који отпада на површину нервних ћелија, као и одређене старосне разлике у том погледу.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Прикупљање ткива. Узорци ткива хуманог желуца уз сагласност Етичког комитета узимани су са обдукцијског материјала на Институту за судску медицину са 30 кадавера оба пола, старосног распона од 20 до 84 године старости. Узорци су узимани са средњег дела предњег зида желуца. Они су у односу на старост особа са чијих су кадавера узети разврстани у три старосне групе: 20 до 44 године, 45 до 64 године и 65 до 84 године. Након узимања узорци ткива су транспортовани у хистолошку лабораторију.

Припрема ткива. Један део исечка ткива величине 1x1 cm је фиксиран у 10% пуферованом параформалдехиду у трајању од 48 часова. Након класичне обраде провођењем кроз серију алкохола узорци су калупљени у парафинске блокове, који су затим резани на два начина; резовима управним на уздужну осовину предњег зида желуца (класично) и резовима паралелним са површином желуца све до мијентеричког сплета и кроз њега. Хистолошки препарати су бојени рутинском методом хематоксилин-еозин, а за сигурну идентификацију ганглијских структура и ћелија бојени су сребронитратом по методи Масон Фонтана и Крезил-виолет бојом.

Бојење сребронитратом по методи Масон Фонтана: Хидратисани препарати се потапају у претходно припремљен раствор сребро-нитрата у трајању од 2

сата на 56°C, испирају се дестилованом водом и тонирају са 0,2% раствором злато-хлорида 2-3 минута, поново се испирају дестилованом водом и 1 минут спуштају у 5% раствор натријум тиосулфата. Поново се испирају дестилованом водом и 5 минута потапају у једарно-брзо црвену боју, затим монтирају на предметна стакла и покривају покровном луспицом. Резултат бојења: аргентафилне грануле у нервних ћелија су црне, једра су ружичасто-црвенкаста, а цитоплазма бледо-ружичаста.

Крезил-виолет бојење (cresyl violet) за нервних ћелија: Хидратисани препарати се остављају у претходно припремљеном раствору крезил-виолета 30 минута. Затим се обезбојавају у 96% алкохолу коме је додата 1 кап HCl и обезбојавање се контролише под микроскопом. Када се добије жељена пребојеност препарати се дехидрирају и монтирају на предметна стакла. Резултат бојења: једра тамноплава, цитоплазма нешто светлија, нервна влакна се не боје.

Један број узорака је третиран хијалуронидазом и инкубиран за 1 до 3 сата на 4°C у медијуму кога су описали Karnovsky и Roots (1965). Састав инкубационог медијума (pH 5,6) је у (mM): натријум-ацетат 60 mM, acetylthiocholine iodide 2mM, natrium citrate 15 mM, CuSO₄ 3mM, K₂Fe (CN)₆ 0,5 mM, Triton-X 100 допуњен инкубациони медијум више од 1% и хијалуронидазом (0,5g/100ml). Након бојења на AchE узорци ткива се фиксирају у неутралном 4% формалину у 0,1 M фосфатном пуферу и обрађују класичном техником резања и монтирања на предметно стакло. Резултат бојења: на препарату се виде златно браон обојена нервна влакна, цитоплазма нервних ћелија је бледа са нешто тамнијим једром.

Микроскопска техника

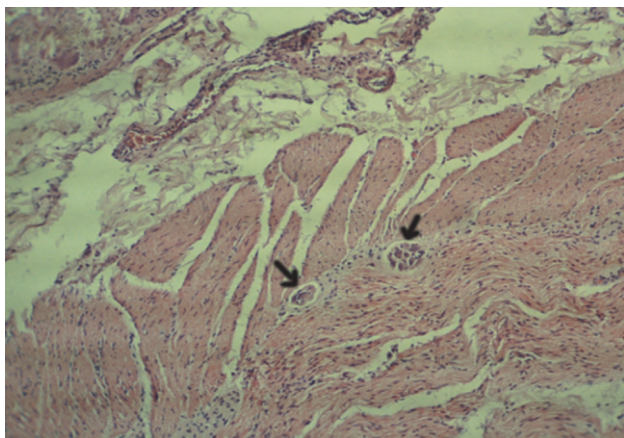
Узорци ткива сечени су на микротому са дебелином реза од 6µm. Анализа је вршена тестним системом М42 који је калибриран на адекватном увећању светлосног микроскопа (Карл Зеис Јена). За мерење просечног пречника ћелија и њихових једара коришћен је окуларни микрометар калибриран на одговарајућем увећању. На сваком препарату предњег зида желуца бројан је број тачака тесног система који пада на ареал који заузима ганглијска структура и број тачака који пада на профиле тела ганглијских ћелија мијентеричког нервних сплета. Поред тога бројан је и укупан број неурона који се налазио у ареалу ганглијске структуре. На сваком препарату анализирано је по 10 видних поља. Добијени подаци уношени су у радне табеле. На основу њих је математичким путем израчунаван број неурона по cm² површине нервних сплета, површина ареала ганглијских структура, укупна површина свих неурона у оквиру ганглијске структуре као и површина појединачних профила тела нервних ћелија.

Статистичка анализа

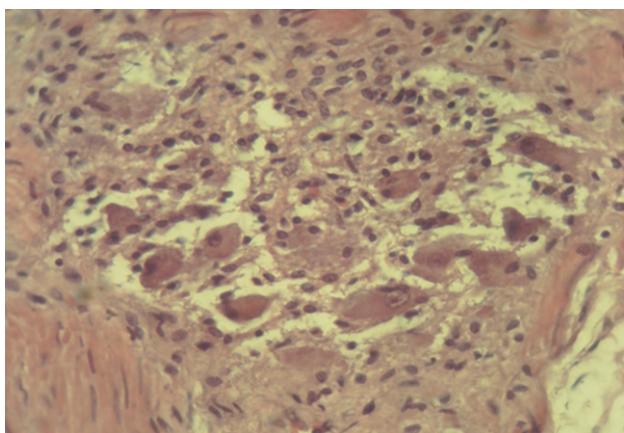
Резултати приказани у тексту, табелама и графиконима су изражени као средње вредности ± стандардна грешка. Тест статистичких значајности између средњих вредности је обављен независним Студент т тестом и анализом варијансе. Значајност је изражена као p<0,05 или p<0,001.

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Мијентерички нервни сплет желуца је састављен из ганглиона који су међусобно повезани сноповима нервних влакана тако да формира полигоналну мрежу између лонгитудиналног и циркуларног мишићног слоја. На попречним пресецима ганглијске структуре мијентеричког нервног сплета су релативно малих димензија и у оквиру сваке од њих примећује се већи број неурона који су међусобно повезани нервним влакнима (слика 1.). На уздужним пресецима предњег зида желуца који су прављени од серозе према слузокожи могу се видети ганглијске структуре мијентеричког нервног сплета различитог облика и величине, у зависности од тога у којој је мери у том резу захваћен сам сплет. Око ганглијских структура налазе се неправилно разбацани снопови глатких мишићних влакана (слика 2.). У самим ганглијским структурама налазе се ганглијске ћелије које могу бити различитог облика и величине и које су груписане у мање или веће групе. Неурони могу бити овални, округли, вретенасти или полигонални са везикуларним једрима која садрже веома мало хроматина.



Слика 1. Попречни пресек кроз желуцац ХЕ 100х (стрелице показују ганглијске структуре мијентеричког сплета)



Слика 2. Уздужни пресек кроз мијентерички нервни сплет желуца; ХЕ 400х

Око ганглијских ћелија могу се уочити неправилно разбацана овална једра потпорних односно глијалних ћелија које се не боје коришћеним техникама бојења.

Први корак у нашем истраживању је одређивање просечне вредности броја ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета желуца у три старосне групе. Добијени су одређени резултати који су приказани у Табели 1.

Табела 1. - Број ганглијских ћелија/cm² површине мијентеричког нервног сплета предњег зида желуца у различитим старосним групама

	20-44 г.	45-64 г.	65-84 г.
Xbar	49326*	48046	41407
SD	1951,0	1399,48	1155,85
SE	617,4	442,87	365,77

*Број ганглијских ћелија /cm² површине мијентеричког сплета

Из Табеле се може видети да је највећи број неурона забележен у најмлађој старосној групи (20-44 године) и износи 49326±1951/cm², а најмањи број неурона у најстаријој групи (65-84 године) и износи 41407 ± 1155,85/cm². Приметно је да се код особа преко 65 година старости у мијентеричком сплету предњег зида желуца налази знатно мањи број неурона.

Број неурона мијентеричког нервног сплета желуца код особа старости од 65-84 године статистички значајно разликује у односу на млађе. Статистичка значајност добијена Студент т-тестом је на нивоу р<0.001

На основу добијених вредности може се израчунати да је губитак ганглијских нервних ћелија мијентеричког нервног сплета код најстаријих (65-84 године) у односу на најмлађе (20-44 године) изражен у процентима износио 15,44%, а према средовечним (45-64 године) 13,81 %.

Морфометријском анализом одређивана је површина ганглијских структура мијентеричког нервног сплета код све три старосне групе. Добијени резултати презентовани су у Табели 2.

Табела 2. - Површина ареала ганглијских структура мијентеричког нервног сплета желуца човека код особа различитог животног доба.

	20-44 г.	45-64 г.	65-84 г.
Xbar	0,01787*	0,01791	0,01784
SD	0,00362	0,00369	0,00176
SE	0,00114	0,00117	0,00056

*Површина ареала ганглијских структура мијентеричког сплета желуца човека изражена у mm²

Из Табеле се може уочити да су површине ареала ганглијских структура подједнаке величине без обзира на старосно доба и крећу се у распону од 0,01791 ±0,00369 mm² код средовечних до 0,01784±0,00176 mm²

код најстаријих. Статистичка обрада података вредности површина ареала ганглијских структура не показује постојање статистички значајних разлика у односу на старосно доба.

У оквиру морфометријске анализе одређивана је површина коју заузимају профили свих ганглијских ћелија унутар ганглијске структуре, односно део површине ганглијских структура мијентеричког нервног сплета који припада профилима нервних ћелија. Добијене вредности су презентоване у табели 3. и изражене су у μm^2 . Може се уочити да је просечна вредност укупне површине ганглијских ћелија најмања код најстаријих (65-84 године) и износи $0,00230 \pm 0,00023 \text{ mm}^2$, а највећа код најмлађих (20-44 године) $0,00343 \pm 0,00071 \text{ mm}^2$.

Табела 3. - Површина ареала ганглијских ћелија унутар ганглијских структура мијентеричког нервног сплета желуца човека изражена у mm^2 .

	20-44 г.	45-64 г.	65-84 г.
Xbar	0,00343*	0,00299	0,00230
SD	0,00071	0,00052	0,00023
SE	0,00023	0,00016	0,00007

*Површина ареала ганглијских структура мијентеричког сплета која припада укупној површини профила неурона изражена у mm^2

Подаци из Табеле 3 су статистички обрађени Студент т-тестом који показује да се укупна површина неурона ганглијских структура мијентеричког сплета желуца најстаријих (65-84 године) значајно разликује у односу на средовечне (45-64 године) и млађе (20-44 године). Разлика је статистичког нивоа значајности $p < 0,001$.

Дошли смо на идеју да би разлике укупне површине ганглијских ћелија унутар ганглијских структура између различитих старосних група биле донекле уочљивије ако би се рачунским путем укупне површине изразиле процентуално. Добијени резултати приказани су у Табели 4. Из Табеле се види да најмањи проценат површине у оквиру ганглијске структуре заузимају ганглијске ћелије код најстаријих особа (65-84 године) и то 12,95%, а највећи код млађих особа (20-44 год.) 19,12%.

У оквиру морфометријске анализе одређивана је и површина појединачних ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета желуца човека у различитим

Табела 4. - Површина ареала ганглијских ћелија унутар ганглијских структура мијентеричког нервног сплета желуца човека изражена у %.

	20-44 г.	45-64 г.	65-84 г.
Xbar	19,12*	16,87	12,95
SD	2,00	1,58	1,07
SE	0,63	0,50	0,34

*Површина ареала ганглијских структура мијентеричког сплета која припада укупној површини профила неурона изражена у %

животним добима. Вредности површина изражене су у μm^2 и приказане су у Табели 5.

Табела 5. - Површина појединачних ганглијских ћелија мијентеричког нервног сплета желуца човека у различитим животним добима изражена у μm^2 .

	20-44 г.	45-64 г.	65-84 г.
Xbar	288,91*	294,72	305,52
SD	26,98	22,61	21,50
SE	15,58	13,06	12,41

*Површина појединачних ганглијских ћелија мијентеричког сплета желуца човека изражена у μm^2

Из Табеле се може уочити да је највећа просечна вредност површине неурона забележена у узорцима ткива старијих особа (65-84 године) и износи $305,52 \pm 21,50 \mu\text{m}^2$. Просечне вредности површина појединачних ганглијских ћелија средовечних (45-64 године) и млађих (20-44 године) не одступају значајно у односу на најстарије. Добијене вредности су тестиране Студент т-тестом који није показао постојање статистички значајних разлика између поређених група на нивоу значајности $p < 0,05$.

ДИСКУСИЈА

Веома су ретка истраживања мијентеричког нервног сплета на хуманом материјалу. У овом истраживању користили смо узорке ткива 30 особа, старосног распона од 20 до 84 године. Наша истраживања су показала да се на попречним пресецима желуца мијентерички сплет види као једна танка, наборана, испрекидана ламеларна структура уметнута између слојева глатке мускулатуре. Практично на овим пресецима он има облик попречно пресечене плоче. Примећује се да је дебљина ове плоче неуједначена, а на местима задебљања уочавају се групе нервних ћелија.

Уздужни пресеци ткива желуца показали су се кориснијим за анализу мијентеричког нервног сплета. Овакав начин резања ткива захтева више напора и непрекидну нативну контролу пресека светлосним микроскопом. Ово је неопходно јер се мора направити велики број серијских резова идући од серозе ка слузокожи. Из мноштва пресека требало је за анализу издвојити само оне који пролазе кроз сам мијентерички нервни сплет.

На оваквим пресецима мијентерички нервни сплет се види у облику мањих или већих плажа ганглијских ћелија око којих су неправилно разбацани снопови глатких мишића.

Основна тежња овог рада је била да се установи неоронална густина по cm^2 површине мијентеричког нервног сплета код особа различитог старосног доба. Истраживања су показала (Табела 1.) да се број неурона/ cm^2 мијентеричког сплета желуца човека кретао од $41407 \pm 1155,85$ код најстаријих (65-84 године) до 49326 ± 1951 код млађих (20-44 године). Код средовечних (45-64 године) број неурона/ cm^2 износио је $48046 \pm 1399,48$. У нама доступној литератури нисмо наишли на податке

са којима би упоредили наше резултате добијене на хуманом материјалу. Међутим, Eduardo Jose de Almeida (13) је 2003. године истраживао регионалне карактеристике неурона мијентеричког сплета колона пацова. Он је са сарадницима користећи Giemsa технику бојења откrio дистрибуцију од 30968 неурона/cm².

Из наших резултата може се приметити, да постоји велики пад у броју неурона/cm² површине мијентеричког сплета у узорцима ткива предњег зида желуца код старијих особа (65-84 године) у односу на особе млађег животног доба. Пад у броју неурона је на нивоу статистичке значајности $p < 0,001$. Процентуално изражено, губитак неурона код старијих (65-84 године) према млађима (20-44 године) износи 15,44%, а према средовечним (45-64 године) 13,81%.

Поред броја неурона/cm² мијентеричког нервног сплета интересовало нас је да ли са старењем долази до настанка разлика у површинама ареала ганглијских структура. Из добијених резултата (Табела 2) може се установити да са старењем не долази до смањења површине ареала ганглијских структура мијентеричког нервног сплета предњег зида желуца човека. Добијене вредности су приближно подједнаке у свим старосним групама.

Наша истраживања су обухватила и одређивање укупне површине ганглијских ћелија унутар ареала ганглијских структура (Табела 3). Добијени резултати показују да са старењем долази до смањења дела ареала ганглијских структура мијентеричког сплета желуца који отпада на површину тела неурона присутних у ганглиону. Из Табеле 4 видимо да процентуално изражено 19,1% површине ареала ганглијске структуре отпада на површину тела неурона код млађих (20-44 године), а свега 12,95% код старијих (65-84 године). Може се закључити да у току старења долази до појаве ганглиона ("празни ганглиони") који су делимично испражњени од тела нервних ћелија. До сличног закључка дошли су Hanani et al, 2004. године (12, 14). Они бележе пад у густини неурона мијентеричког сплета колона човека са старењем и појаву тзв. испражњених ганглиона.

Наша истраживања су обухватила и одређивање вредности просечне површине тела појединачне ганглијске ћелије мијентеричког нервног сплета предњег зида желуца човека у свим старосним групама (Табела 5). Добијене вредности показују да не постоје битне разлике у површини тела ганглијских ћелија у односу на старосно доба.

ЗАКЉУЧАК

Мијентерички нервни сплет предњег зида желуца човека одликује се присуством великог броја неурона. Као и све остале структуре човечијег организма и он је подложен променама у току процеса старења. Са старењем долази до губитка броја неурона. Ганглијске

структуре су код старијих особа делимично испражњене од тела нервних ћелија "празни ганглиони". Са старењем не долази до значајних измена у величини неурона. Вредности пада броја неурона код старијих особа (65-84 године) према млађим крећу се од 13,81% до 15,44%. Овај налаз поткрепљује чињеница да у оквиру ареала ганглијских структура код старијих долази до одређеног смањења површине фазе која припада површини тела неурона који се налазе у датој структури.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hadžić M.: Histološki kriterijumi degenerativnih promena simpatickog neurona. Gl. Klin. Biol. Novi Sad 1975; 2-55.
2. Stefanović N.: Procena histoloških promena na ganglijskim ćelijama gornjeg vratnog gangliona primenom stereoloških metoda u procesu starenja kod čoveka. Doktorska disertacija. Niš; 1987.
3. Hall KE.: Aging and neural control of the GI tract: II. Neural control of the aging gut, an old dog learn new tricks? Am J Physiol. 2002;283:827-832.
4. Wade PR. Aging and neural control of the GI tract: I. Age-related changes in the enteric nervous system. Am J Physiol. 2002;283:489-495.
5. Camilleri M, Lee JS, Viramontes B, Bharucha AE, Tangalos EG. Insights into the pathophysiology and mechanisms of constipation, irritable bowel syndrome, and diverticulosis in older people. J Am Geriatr Soc. 2000;48:1142-1150.
6. Madsen JL. Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times. Dig Dis Sci. 1992;37:1549-1553.
7. Gabella G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. Gastroenterology. 1989;96:1487-1493.
8. De Giorgio R, Stanghelini V, Barbara G, Corinaldesi R, De Ponti F, Tonini M, Bassotti G, Sternini C. Primary enteric neuropathies underlying gastrointestinal motor dysfunction. Scand J Gastroenterol. 2002;35:114-122.
9. Takahashi T, Qoubaitary A, Owyang C, Wiley JW. Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. Brain Res. 2000;883:15-21.
10. Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Aging of myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. Auton Neurosci. 2003;106:69-83.
11. Csernia T, Parana S, Puri P. The effect of age on colocalization of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining in enteric neurons in an experimental model. J Pediatr Surg. 2007;42:300-304.
12. Hanani M, Fellig Y, Udassin R, Freund HR. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. Auton Neurosci. 2004;113:71-78.
13. Eduardo Jose de Almeida Aracijo; Debora De Mello Gonsales Sant' Ana; Sonia Lucy Molinari; Marcilio Hubner de Miranda Neto: Regional differences in the number and type of myenteric neurons in the descending colon of Rats; Arq. Neuropsiquiatr 2003; 61 (2A): 220-225.
14. Sri Paran T, Rolle U, Puri P.: Age-related changes in the myenteric plexus of the porcine bowel. J Pediatr Surg. 2009 Sep;44(9):1771-7.