

Lilia Sinițina, V. David, V. Petrovici, Șt. Samciuc, G. Boian, V. Boian  
**ACTUALITĂȚI ÎN EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR STRUCTURAL-FUNCȚIONALE  
ALE SISTEMULUI NERVOS ENTERAL LA COPII**

*IMSP Institutul Mamei și Copilului (Director – dr. șt. med., conf. univ. S. Gladun)*

---

**SUMMARY**

---

**ACTUALITIES IN THE EVALUATION OF STRUCTURAL-FUNCTIONAL PARTICULARITIES  
OF THE ENTERAL NERVOUS SYSTEM OF THE CHILDREN**

**Key words.** Hirschsprung disease, nervous plexus, immaturity, NADPH-diaphorase, monoclonal antibodies, immunohistochemistry.

**Background.** *The need to thoroughly assess the structural-functional particularities of the enteral nervous system in children with intestinal transit problems requires rapid and informative diagnostic methods in the preoperative or intraoperative biopsy material, subsequently with reflection in the medical-surgical conduct.*

**Material and methods.** *The study material consisted of intestinal tissue samples taken by primary and intraoperatively biopsy from 33 patients operated for congenital intestinal malformations with chronic colostation. The coloring methods used were the following: hematoxylin-eosin (HE), van Gieson (VG) with picrofiscine, IHCh using primary Neuron Specific monoclonal antibodies enolase (NSE), Neurofilament Protein (NFP), Synaptophysin (SYP), Bax and BCL2 and polyclonal Chromogranin A (CGA), ready to use (Dako) and histo-enzymological method for the identification of NADH-diaphorase.*

**Results.** *The implemented histo-enzymological method for identification NADH-diaphorase maded possible to detect the neurocelulare elements Dogel I located in the nerve plexus of the intestinal wall. In 33.3% of the cases agangliosis has been detected. At the same time, there were revealed various deviations of the number, location, and ganglio-neuronal dysplasia changes.*

**Conclusions.** *1. Evaluation of structural-functional particularities of the ganglion-neuronal nervous system in colon pathologies in children leded to their differentiation into primary and secondary. At the same time, it was established remote persistence of the dismay issues, which have a congenital, but clinically delayed genesis. 2. Significance of exposed methodology using pre- and intraoperative biopsy consists in perfecting the morphopathological diagnosis through morphopathological methods with involvement in clinical morphopathology, as well as optimization of medical-surgical management.*

---

**РЕЗЮМЕ**

---

**СОВРЕМЕННЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ  
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ**

**Ключевые слова:** Болезнь Гиршпрунга, нервные сплетения, незрелость, NADPH-диафараза, моноклональные антитела, иммуногистохимия

**Введение.** *Необходимость в тщательном анализе структурно-функциональных особенностей иннервации кишечника у детей с нарушениями кишечного транзита привело к поиску, наряду с использованными комплексными методами, новых информативных, быстрых и качественных диагностических методов исследования преоперационного или интраоперационного биопсийного материала, с последующим применением результатов в медико-хирургическом ведении больного.*

**Материалы и методы.** *Материал для исследования состоял их тканевых проб стенки кишечника при первичной пре- и интраоперационной биопсии взятой у 33 пациентов оперированных по-поводу кишечных пороков развития. Были использованы следующие методы окраски: гематоксилин-эозин, ван Гизон с пикрофуксином, иммуногистохимия с использованием моноклональных первичных антител Neuron Specific Enolase, Neurofilament Protein, Synaptophysin, Bax și BCL2 и поликлональный Chromogranin A (CGA), готовые к использованию (Dako) и гистоэнзимологический метод для идентификации NADH-диафаразы.*

**Результаты.** *Внедрен гистоэнзимологический метод для идентификации NADH-диафаразы, что дало возможность высокой идентификации нейронов Dogel I нервных сплетений кишечника. В 33,3% случаев установ-*

лен диагноз аганглиоз. Также были выявлены разнообразные нарушения численности и локализации нейронов, а также ганглио-нейрональные дисплазии.

**Выводы.** 1. Анализ структурно-функциональных особенностей нервной ганглио-нейрональной системы в патологии толстого кишечника у детей привело к их дифференциации на первичные и вторичные. Также, выявлено наличие аспектов незрелости нервных ганглиев, врожденного генеза, с задержанным клиническим эффектом. 2. Значимость использованной методологии с использованием пре- и интраоперационной биопсии, состоит в улучшении морфопатологической диагностики и внедрением в клиническую морфопатологию, а также к оптимизации медико-хирургического менеджмента.

**Introducere.** Necesitatea evaluării minuțioase a particularităților structural-funcționale ale inervației enterale la copiii cu probleme de tranzit intestinal impune căutarea, în cadrul metodelor complexe de investigație morfofopatologică, a unor metode informative, rapide și calitative de diagnostic în materialul biopsic preoperator sau intraoperator, ulterior cu reflecție în conduita medico-chirurgicală.

În normă plexurile nervoase sunt localizate la nivelul submucoasei și tunicii musculare. În submucoasă sunt prezente două plexuri nervoase: primul situat în imediata vecinătate a muscularei mucoasei (plexul submucos superficial), format din neuroni și celule satelite dispuse printre elementele conjunctive (plexul Meissner), iar cel de-al doilea plex este situat în vecinătatea muscularei proprii (tunica musculară) – plexul Henle sau plexul submucos profund. Se deosebesc neuroni de tipul Doghel I, Doghel II (în număr mult mai mic), mini-neuroni, neurocite filiforme (satelite) și glia. În tunica musculară, plexul neural e localizat între straturile musculare – plexul mienteric Auerbach [4].

Neuroni de tipul Dogel I conțin dendrite scurte și axon lung (în plexul Auerbach) ascendă până la nivelul lamei proprii a tunicii mucoase atingând membrana bazală și înconjurând zona bazală a epitelocitelor participând la reglarea funcțională a celulelor caliciforme, apical-granulare Panet și bazal-granulare Kulcițki, dar și participă la reglarea funcției musculaturii netede, în special mediază relaxarea miocitelor netede în sfincterul anal intern [4]. Pe lângă aceasta acești neuroni sunt colinergici și produc oxid nitric (NO) constitutiv cu participarea nemijlocită a acetilcolinei – considerată cel mai important trigger al sistemului nitroxidergic [5]. Cercetările aparatului nervos intestinal la nivel molecular prin metoda imunohistochimică (IHCh), a stabilit la pacienții cu maladia Hirschsprung anomalii ale expresiei anticorpului monoclonal Anti-Synaptophysin, care este o proteină a veziculelor sinaptice prezentă în toți neuronii și organitele neuron-specifice [1].

E stabilit, că în rect, unde se detectă cele mai frecvente tulburări ale inervației, aproximativ 74% din neuroni sunt nitroxidergici. Oxidul nitric se produce în neuroni cu participarea enzimei NO - sintaza, care posedă activitate NADPH-diaforazică (nicotinamid-dinucleotid-fosfataza) și, din aceste considerente, activitatea NADPH-diaforazică este conside-

rată drept marker topochimic al neuronilor ce produc NO [2, 3].

În acest context, în ansamblul de metode morfologice utilizate pentru stabilirea modificărilor structural-funcționale ale inervației enterale, identificarea NADPH-diaforazei furnizează date suplimentare despre componența neurocelulară ganglioneuronală.

**Scopul** studiului a servit stabilirea particularităților morfofopatologice ale inervației enterale la copiii cu diverse patologii însoțite de tulburări ale tranzitului intestinal.

**Material și metode.** Materialul de studiu constituit din probe tisulare intestinale s-a prelevat prin biopsie de diagnostic primar și biopsie intraoperatorie de la 33 pacienți operați pentru vicii congenitale intestinale cu colostază cronică și megacolon. Pentru diagnosticul preoperator biopsatul se preleva cranial de linia dentată cu cel puțin 1,0 cm. Biopsia intraoperatorie se efectua la nivelul intestinului stasmat și, suplimentar, la nivelul vizual sănătos. Probele tisulare preconizate pentru cercetări histoenzimologice se congelau în azot îndată după prelevare, după care se fixau pe măsura de congelare a criotomului, se congelau la  $^{\circ}C -30^{\circ}C$  și se confecționau secțiuni criotomice cu grosimea de 8 $\mu$ . Probele tisulare prelevate pentru metodele clasice și IHCh erau fixate în sol. Formol tamponat (pH 7,2-7,4) timp de 12-24 ore, se efectua procesarea chimică prin metoda clasică și se includeau în parafină. Metodele de colorare utilizate au fost următoarele: hematoxilină-eozină (HE), van Gieson (VG) cu picrofiscină, IHCh cu utilizarea anticorpilor primari monoclonali *Neuron Specific Enolase (NSE)*, *Neurofilament Protein (NFP)*, *Synaptophysin (SYP)*, *Bax* și *BCL2* și policlonal *Chromogranin A (CGA)*, gata de utilizare (Dako) și metoda histoenzimologică pentru identificarea NADH-diaforazei.

**Rezultate.** Întru îmbunătățirea diagnosticului pre- și intraoperator al modificărilor inervației enterale în Laboratorul științific de morfofpatologie al IMSP IMșiC s-a implementat metoda histoenzimologică pentru identificarea NADH-diaforazei (fig. 1, 2), ce a făcut posibilă vizualizarea rapidă, calitativă și informativă a tuturor elementelor neurocelulare ganglionare localizate în plexurile nervoase submucoase și intermusculare ale peretelui intestinal (fig. 3, 4).



Fig. 1. Decuparea secțiunilor criotomice. Laborant histolog Grechin Maia.

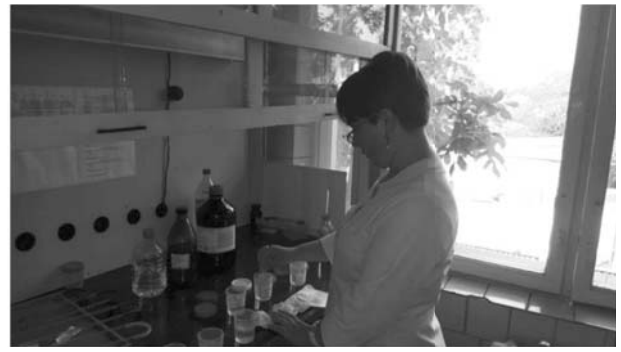


Fig. 2. Procesarea histoenzimologică a secțiunilor criotomice. Laborant superior Cecoltan Svetlana



Fig. 3. ← Plexul neural submucos Meissner în normă. Reacie histoenzimologică pentru identificarea NADH-diaforazei.  $\times 100$

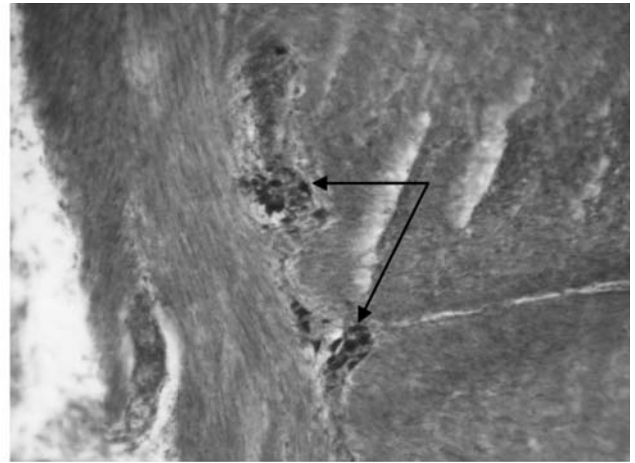
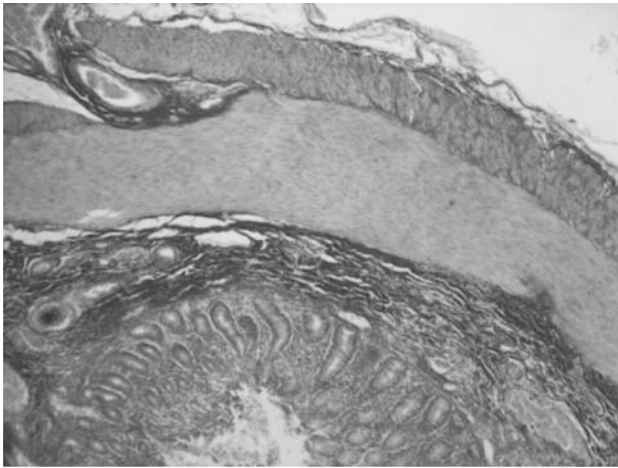


Fig. 4. ← Plexul neural mienteric Auerbach în normă. Reacie histoenzimologică pentru identificarea NADH-diaforazei.  $\times 200$

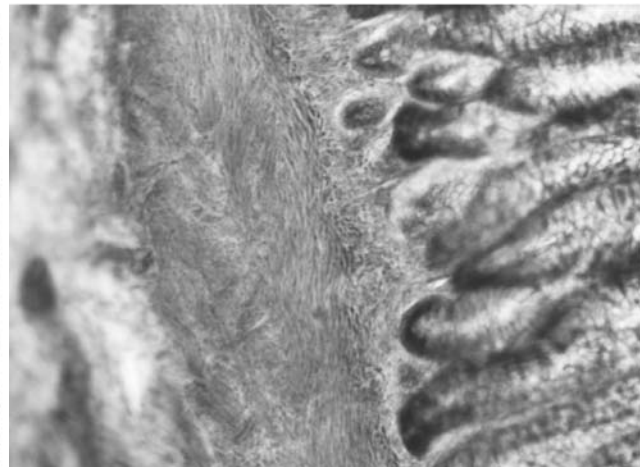
Investigația morfologică complexă în 33,3% din cazuri a stabilit lipsa totală a structurilor ganglio-neuronale în submucoasă și tunica musculară, cu accentuarea fibrelor conjunctive, în special în submucoasă în segmentul intestinal spasmă (fig. 5, 6), fiind stabilit diagnosticul de aganglionoză (Boala Hirschsprung).

O altă particularitate detectată în cadrul cercetărilor este devierea numerică a structurilor ganglio-neuronare (în normă 7-8 neuroni), ce s-a manifestat în cercetările noastre prin hipoganglionoză, manifestându-se prin atestarea, în limita bioptatului, a unor plexuri ganglio-neuronale solitare, rudimentare (fig. 7). De regulă hipoganglionoză era însoțită de reducerea numărului de celule neurale sau puteau fi întâlnite plexuri nervoase de dimensiuni normale cu o reducere considerabilă a numărului de neuroni, aceștia fiind detectați solitar sau în grupuri (9,1%) (fig. 8, 9). În 6,1% din cazuri s-a detectat un număr sporit de celule neurale (hiperneierie), atestându-se uneori în număr de 17-19. De regulă, hiponeieria era atestată

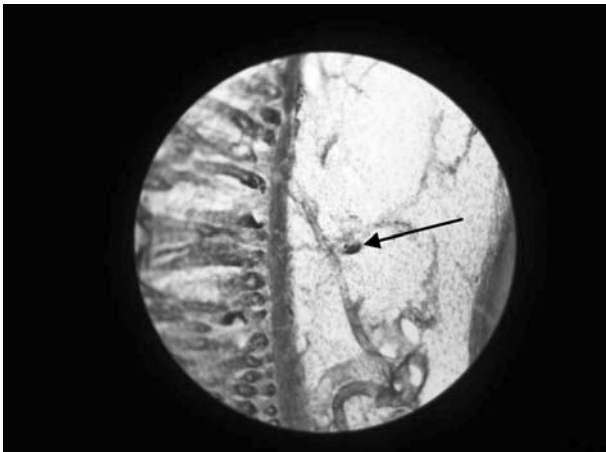
în structurile ganlio-neuronale gigante, care fiind atestate în submucoasă se interpretau ca și DNI (fig. 10). De rând cu aceste modificări s-au detectat particularități histopatologice caracteristice pentru displazii tisulare ganglio-neuronale care, însă, nu se includea în clasificarea unităților nosologice definite (fig. 11). Nu în ultimul rând, erau prezente particularități ale dimaturității tisulare (30,3%), ce s-au relevat prin prezența elementelor neurale imature, retardate, care la aplicarea anticorpului monoclonal neurotrop *NSE* a stabilit expresie redusă a acestuia (fig. 12). Aplicarea anticorpului *Bcl-2* responsabil pentru detectarea celulelor imature cu control al anticorpului *Bax*, a relevat expresie pozitivă, ceea ce pledează pentru prezența elementelor neurocelulare imature (fig. 13-14). Printre modificările morfopatologice adiționale, care se atestau în biopate se înscriu modificările distrofice de diversă intensitate, adesea extrem de pronunțată, neformarea țesutului fibroziv, procesul inflamatoriu, depleția limfocitară foliculară, adesea cu reducerea foliculilor limfatici și tulburări circulatorii acute.



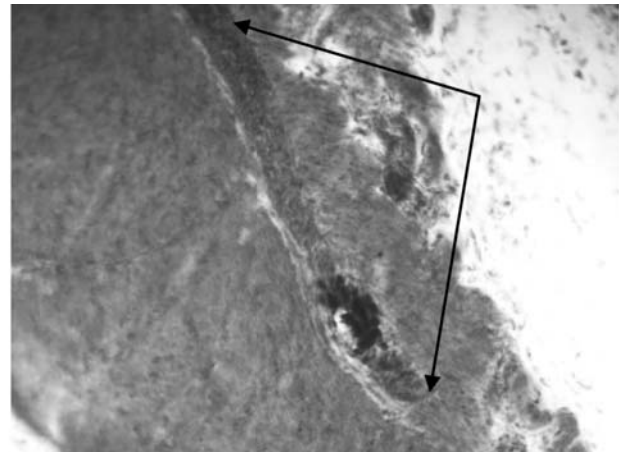
*Fig. 5. Aganglioneuroza submucoasei și a tunicii musculare. Biopsie intraoperatorie. Colorație van Gieson cu picrofuchsină. ×50*



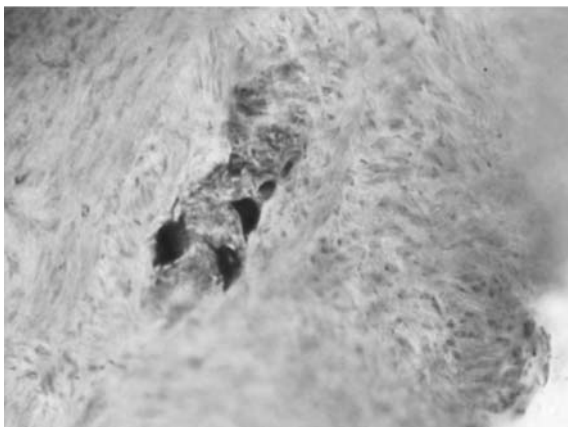
*Fig. 6. Aganglioneuroza submucoasei. Biopsie preoperatorie. Reacție histoenzimologică pentru identificarea NADH-diaforazei. ×50*



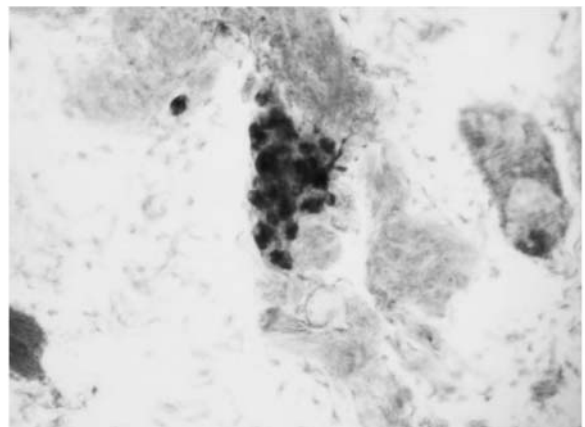
*Fig. 7. Tulburări ale inervației colonice-hipoganglionoză. ←Ganglion nervos submucos superficial Meissner solitar la nivelul segmentului distal rectocolonic. Biopsie preoperatorie. Reacție histoenzimatică pentru identificarea NADH diaforazei. ×50*



*Fig. 8. ←Ganglion nervos mienteric Auerbach cu hiponeierie. Biopsie intraoperatorie. Reacție histoenzimatică pentru identificarea NADH diaforazei. ×50*



*Fig. 9. Ganglion nervos mienteric Auerbach cu hiponeierie (3 neuroni). Biopsie intraoperatorie. Reacție histoenzimatică pentru identificarea NADH diaforazei. ×50*



*Fig. 10. Ganglion gigant cu hiperneierie (aproximativ 17). Biopsie preoperatorie. Reacție histoenzimologică pentru identificarea NADH diaforazei. ×50*

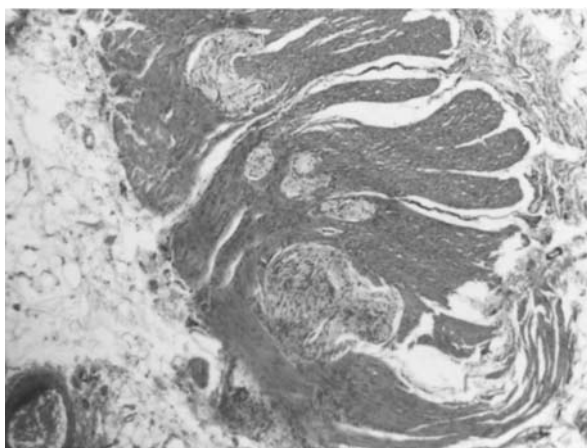


Fig. 11. Disganglionoză mienterică. HE.  $\times 100$

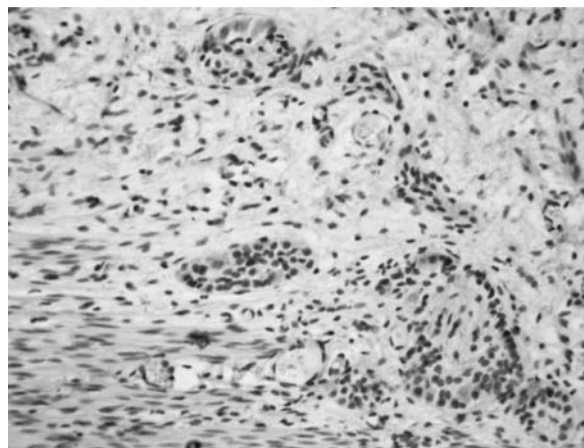


Fig. 12. Dismaturiție mienterică. HE.  $\times 200$

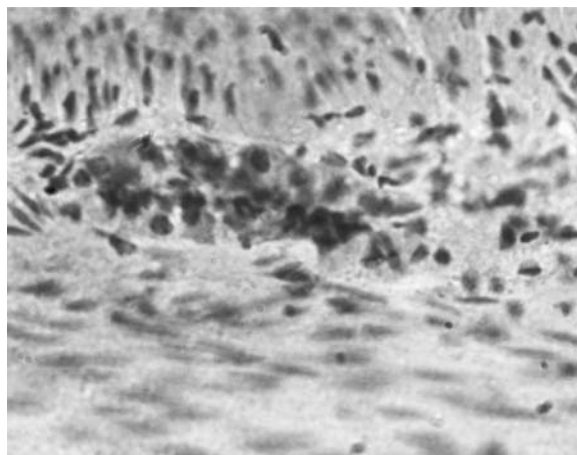


Fig. 13. Pacientul C. Ganglion neural mienteric colonic. Imunomarcaj 2+ pentru Bax. Reacție imunohistochimică. Tehnica LSAB2,  $\times 400$ .

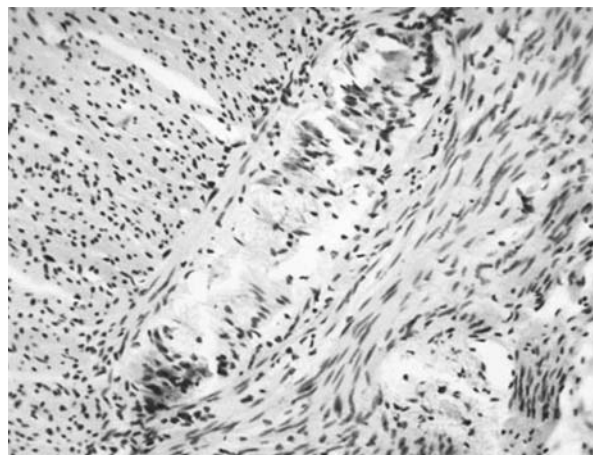


Fig. 14. Ganglion neural mienteric colonic. Imunomarcaj 2+ pentru Bcl 2. Reacție imunohistochimică. Tehnica LSAB2,  $\times 200$ .

**Discuții.** Așadar, în baza modificărilor histopatologice atestate în biopsatele pre- și intraoperatorii, s-a stabilit că originea disfuncțiilor de tranzit intestinal este determinată de modificările sistemului nervos ganglio-neuronal în formă de patologii primare sau secundare, ultimele deși sunt declanșate intrauterin produc manifestări clinice tardive. Utilizarea evaluării complexe a materialului prelevat prin biopsie pre- și intraoperatorie cu implementarea metodei histoenzimologice pentru identificarea NADH-diaforazei a perfectat diagnosticul morfopatologic în detectarea dereglărilor inervației enterale, având contribuție în conduita intraoperatorie.

#### Concluzii.

1. Evaluarea particularităților structural-funcționale ale sistemului nervos ganglio-neuronal în patologiele de colon la copii a condus la diferențierea acestora în primare și secundare. Totodată, s-a stabilit persistența la distanță a aspectelor de dismaturiție, care au o geneză congenitală, dar cu efect clinic întârziat.

2. Semnificația metodologiei expuse, prin utilizarea biopsiei pre- și intraoperatorii, constă în perfectarea

diagnosticul morfopatologic prin metode morfopatologice cu implicare în morfopatologia clinică, precum și optimizarea managementului medico-chirurgical.

#### Bibliografie selectivă

1. Corsois L., Boman F., Sfeir R. Anomalies d'expression de la synaptophysine dans la maladie de Hirschsprung. *Annales de Pathologie*. 2004; vol. 24, nr 5, p. 407 – 415.
2. Hope B. T., Michael G.J., Knigge K. M., Vinsent S. R. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 2811 – 2814.
3. Moroz L. L., Chen D., Gillette M. U., Gillette R. Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J. Neurochem*. 1996; 66:873 – 876.
4. Raica M., Mederle O., Căruntu I-D. et al. Histologie teoretică și practică. Timișoara, România, 2004; 491p.
5. Метельская В. А., Гусманова Н. Г. Оксид азота: роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека. *Лабораторная медицина*. 2005; №7, с. 19 – 24.