

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Д-Р НИКОЛА ЛЮБОМИРОВ ПИРОВСКИ**

**МОРФОЛОГИЧНИ И НЕВРОХИМИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ**  
**ПРИ АКУПУНКТУРА НА ЕЗИК**

**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: доц. д-р Николай Димитров Димитров, дм**  
**Научен ръководител: доц. Димитринка Йорданова Атанасова, дб**

**Официални рецензенти:**

**проф. д-р Стефан Тодоров Сивков, дм**  
**проф. д-р Ангел Петров Воденичаров, двмн**

**СТАРА ЗАГОРА, 2022**

Дисертационният труд е написан на 128 стандартни страници и е онагледен с 39 фигури (28 комбинирани микрофотографии, 10 графики и диаграми и 1 схема), 4 таблици. В библиографския списък са включени 215 литературни източника, от които 37 на кирилица и 178 на латиница.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на Разширен катедрен съвет на Катедра „Анатомия“ към Медицински факултет при Тракийски университет – Стара Загора, проведен на 16.06.2022 г.

Изследванията по дисертацията са извършени основно в хистологичната и имунохистохимична лаборатория в Катедра „Анатомия“ на Медицински факултет към Тракийски университет – Стара Загора.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2022 г. от .00 часа в Академичната зала на *Медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора*, ул. Армейска 11.

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на *Медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора*, ул. Армейска 11, Деканат, ет. 2, стая 18.

## **Б Л А Г О Д А Р Н О С Т И**

Изпълнен съм с благодарност към баща си **Любомир Пировски**, който постоянно ме мотивираше за завършване на докторската дисертация.

Научните ми ръководители, **доц. д-р Николай Димитров** и **доц. Димитринка Атанасова**, заслужават адмирации, не само за професионализма и съветите за експерименталната работа, но и за голямото търпение и разбиране в условията на трудна комуникация и обществена криза. Без тяхното ръководство аз нямаше да успея да обобщя и разширя резултатите по този ползотворен начин.

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.</b>	<b>5</b>
<b>I. УВОД</b>	<b>6</b>
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	<b>6</b>
<b>III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ</b>	<b>7</b>
3.1 Експериментални животни	7
3.2 Хистологични техники	8
3.3 Имунохистохимични техники.	9
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ</b>	<b>11</b>
4.1 Нормален морфологичен строеж на език.	11
4.2 Морфологични промени след експериментална акупунктура в точка Ех-НН-10 на език.	29
<b>V. ОБСЪЖДАНЕ</b>	<b>39</b>
5.1 Нормална морфология в акупунктурна точка Ех-НН-10 на езика.	39
5.2 Изменения в морфологията в акупунктурна точка Ех-НН-10 на езика при плъх след акупунктура.	42
<b>VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>48</b>
<b>VII. ИЗВОДИ</b>	<b>48</b>
<b>VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b>	<b>49</b>
<b>IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b>	<b>50</b>
<b>X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ</b>	<b>50</b>
<b>XI. SUMMARY</b>	<b>51</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### На кирилица

АК	акупунктура (иглоубождане)
БАТ	биологично активна точка
ЗМ	замразяващ микротом
ПС	парафинов срез
ТКМ	традиционна китайска медицина
ЦНС	централна нервна система

### На латиница

5-HT	5-хидрокситриптамин (серотонин)
CGRP	калцитонин ген-родствен пептид
CRH	кортикотропин-освобождаващ хормон
FMA	основен модел на анатомичната онтология
GMFM	измерване на грубите моторни функции
H&E	хематоксилин – еозин
MeSH	речник, използван за индексирание на статии за PubMed
NLM	национална библиотека по медицина
PEDI	педиатричната оценка на инвалидността
SFS	повърхностна фасциална система
SP	субстанция Р
TA	Международен стандарт за човешка анатомична терминология
VIP	вазоактивен интестинален пептид
ас	акупунктурен канал, иглен канал, иглен тракт (канал, образуван в тъканите от акупунктурната игла)

## I. УВОД

Традиционните медицински практики от различни части на света и в частност акупунктурата имат своето място в медицинската практика и са включени в закона за здравето като алтернативни методи за подобряване на здравето. Тяхното използване никога не е прекъсвало, а в съвременното са в подем. Китайската традиционна медицина има няколко основни направления едно от което е акупунктурата. Акупунктурата на езика като вид манипулация представлява интерес за нашето проучване с морфологичните ѝ аспекти. Морфологичните изменения, които настъпват в тъканите след иглоубождането, може да бъдат установени и документирани с помощта на обективни, съвременни хистологични методи. Количественото измерване е улеснено от компютърни програми за хистоморфометрични методи.

Езикът е плътен мускулест орган разположен в устната кухина свързан със съществени функции в живия организъм. От тази гледна точка той винаги е представлявал интересен обект за изучаване, както от морфологията, така и от клиниката. Близкото му разположение до централната нервна система (ЦНС) и богатата му инервация го прави област за рефлексологични манипулации. Манипулациите върху него са бързи, лесни и същевременно ефективни. Напредъкът в хранително-вкусовата и фармацевтични индустрии също насочва интереса към езика като място за прилагане на нови вещества, като стимуланти за вкусовия анализатор или сублингвални системи за пренос на лекарства. Един от първите органи в досег с антигените на околната среда е езика, което засилва неговата роля за имунната реакция на организма и може да се проучва във връзка със съответните клинични проявления като имунна реакция и автоимунни заболявания. Нашият интерес към него в това проучване е фокусиран върху морфологичните промени, които настъпват в езикът в резултат на акупунктура, както и към нормалната му морфология.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта** на настоящото изследване е да се установи организацията на нормалните структури в езика при плъх, възрастовите промени настъпващи в тях и морфологичните промени, настъпващи след експериментална акупунктура.

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

1. Да се избере подходяща техника за анестезиране на опитните животни.
2. Да се усъвършенства методиката за бързо и точно откриване на точката, вземане на материал, и неговата обработка с цел максимално добро визуализиране на акупунктурния канал.
3. Чрез използване на подходящи хистологични методики и имунохистохимични реакции да се демонстрира нормалната морфологична организация в езика при плъх.

4. Да се отчетат морфологични промени в езика след експериментална акупунктура при плъх, чрез следните подзадачи:
- Да се установи имунохистохимично наличието или липсата на серотонин и триптаза- позитивни клетки.
  - Да се изследват анатомичните структури в областта на точката Ех-НН-10 и да се изследва тяхната роля в осъществяване на ефекта от акупунктурата.
  - Да се изследват мастоцитите, тяхното разпределение и количествено определение в областта на точка Ех-НН-10 на езика избрана за проучването при плъх. Да се наблюдават измененията, които настъпват в мастоцитите в областта на акупунктурния канал след експериментална акупунктура в изследваната точка.

## **III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **3.1 Експериментални животни**

За експериментални животни в настоящото изследване бяха използвани плъхове, порода *Wistar*. Изследвани бяха езиците на общо 42 нормотензивни *Wistar* плъха от двата пола с телесно тегло между 220 – 410 гр. и възраст между 20 дена и 48 месеца. Плъхове на възраст 28 месеца с тегло 355 – 410 гр. бяха доставени от Медицински университет – Пловдив по научноизследователски проект (НИП) № 9/20 с издадено разрешително № 193 от Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) за използване на животни в опити. В проведените експериментални изследвания работихме и върху езици на плъхове осигурени по НИП 13/17 към Тракийски университет – Стара Загора и издадено разрешително №174.

Всички изследвания бяха проведени съгласно нормативната уредба за работа с експериментални животни в Република България и са в съответствие с етичните норми, указани в правилата на Катедрата по анатомия при Медицински факултет към Тракийски университет – Стара Загора, съобразени са с Европейската директива за хуманно отношение към животните и са съгласувани с Комисията за етично отношение с хора и животни.

Плъховете *Wistar* са линия, която е разработена през 1906 година в института *Wistar*, за да послужи като модел-организъм за използване в биологични и медицински изследвания.

Нормотензивните плъхове порода *Wistar* бяха избрани при нашите експериментални изследвания поради няколко причини:

- 1) Съществува принципно съответствие на акупунктурни точки при човек и плъх.

- 2) Възможност за осъществяване и провеждане на сложни морфологични изследвания в езика и установяване на ефекта от иглоубождането, което не е етично и възможно при хора.
- 3) Плъхът е едно от най-използваните лабораторни животни за биомедицински изследвания в България, Западна Европа и Китай. Използва се от повечето автори за научни изследвания, включително и такива за изследване на ефекта от акупунктурата.

## 3.2 Хистологични техники

### 3.2.1 Вземане и подготвяне на материала

Акупунктурата при животни има своите особености, като фиксиране на животното и анестезия. При акупунктура на езика, фиксирането на животното е трудно, поради което се налагаше да провеждаме акупунктура след прилагане на упойка. Фиксирането на животното предизвиква имобилизационен стрес, поради което то се стреми да се освободи.

За светлинномикроскопските изследвания сме използвали материал от език от 42 плъха, порода *Wistar*. Животните бяха първоначално премедикирани с етер за 5 мин., последвано от интраперитонеално инжектиране на ксилазин и кетамин (40-80 mg/kg т.т). След анестезията, опитните животни бяха убождани с акупунктурна игла с размери 0.22x13mm (*Beijing Zhongyan Taihe Medical Instrument Co., Ltd., China*), в продължение на 10 мин., в 2 стандартни точки в сагиталната равнина, в зоните за сърцето и стомаха по горната повърхност – Ех-НН-11 (Найquan – морски извор) и Ех-НН-10. (Juquan – събиране на пролетта). Откриването на точки по езика е изключително трудно, поради голямата му подвижност. Точките се локализираха по разработена от нас методика, като първо се поставяше пластмасов водач и след това през него се въвеждаше иглата. При поставяне на иглата на долната повърхност на езика, резците при плъха се използваха за ориентир и иглата се поставяше между тях. Въпреки това по-удачно е да се говори за поставяне на иглата в зона, която е по-голяма от точка и има същото устройство и комуникации. Въвеждането на игла в точката позволява да се установят нейните взаимоотношения с околните структури в дълбочина и точно да се определи мястото на акупунктурната точка. Заедно с поставената игла плъховете бяха перфузирани през възходящата аорта с 4 % параформалдехид (*Merck, Germany*) в 0.1 М фосфатен буфер (рН 7.36). Дисекциите се извършиха чрез прерязване клоновете на долната челюст и последващо прерязване на езика близо до неговия корен. Установихме, че тъканните проби от език се фиксират по-добре в 10% формалин. Оформените тъканни блокчета 5x5x5 mm се оставяха през нощта за дофиксиране в същия фиксатор на 4°C. След фиксиране материалът се промиваше от остатъчното количество фиксатор за 24 часа с чешмяна вода. Включването на материала в парафин се извършваше по два начина с цел откриване на по-добрия метод за приготвяне на препарати. Тъканните блокчета бяха включени в парафин



заедно с иглата при една част от пробите (Фиг. 11А), а при друга част без иглата (Фиг. 11Б). При някои от опитните плъхове беше взет материал от точката Ех-НН-11, без забиване на игла в точката с цел установяване на нормалната морфологична структура в нея.

Включването на материала в парафин изисква обезводняването на изследваната тъкан през възходяща редица от алкохоли, започвайки с поставянето му в 70% етанол за 1 h, след което късчето тъкан се прехвърля в 80% етанол отново за 1 h, последвано от 96% етанол за 1 h, 100% етанол – 2 пъти от 60 до 90 min. Следващата стъпка е просветляване на материала в кедрово масло, докато потъне на дъното на съда, което може да отнеме няколко дни. След трикратно промиване в бензол (3 пъти по 10 min), материалът се поставяше в преходна среда от бензол и парафин за 30 min в термостат при температура 56°C. След това тъканното блокче се поставяше в първи парафин за 1 h на 56°C в термостат, след което късчето тъкан пренощува във втори парафин до следващата сутрин също на 56°C, след това се прехвърляше в трети парафин за 2 h и накрая изследвания материал се включваше в парафиново блокче.

Рязането на парафиновите блокчета беше извършено с помощта на парафинов микротом: Biocut Reichert–Jung 1130 или Leica RM 2235 при дебелина на срезове 5, 7, 10  $\mu\text{m}$ , като серийните срезове се улавяха върху хром-желатинирани предметни стъкла – за имунохистохимия и стъкла с покритие глицерин–желатина за рутинно оцветяване.

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

### **3.2.3 Оцветяване с толуидиново синьо**

### **3.2.4 Оцветяване по метода Bismark brown**

### **3.2.5 Оцветяване по метода на van Gieson**

### **3.2.6 Трихромно оцветяване с Azan по Heidenhain**

### **3.2.7 Оцветяване с орцеин**

## **3.3 Имунохистохимични методи**

Имунохистохимичните реакции се извършваха върху парафинови срезове с дебелина на срезове 5, 7 и 10  $\mu\text{m}$  по следния начин:

1. Депарафиниране на парафиновите срезове и довеждането им до вода.

Депарафинирането на срезове се осъществяваше по следния начин: ксилол: 3 пъти x 5 min, абсолютен етилов алкохол 100% – 2 x 3 min, 96% етилов алкохол – 3 min, 80% етилов алкохол – 3 min, 70% етилов алкохол – 3 min, дестилирана вода: 2 пъти x 5 min.

2. Демаскиране на антигена с помощта на уред за варене на пара за 30 мин.

2.1 При имунохистохимичните реакции за доказване на триптаза сме използвали EnVision Flex буфер с pH = 9.0;

2.2 При реакциите за доказване на серотонин сме използвали 0.01M цитратен буфер с pH = 6.0;

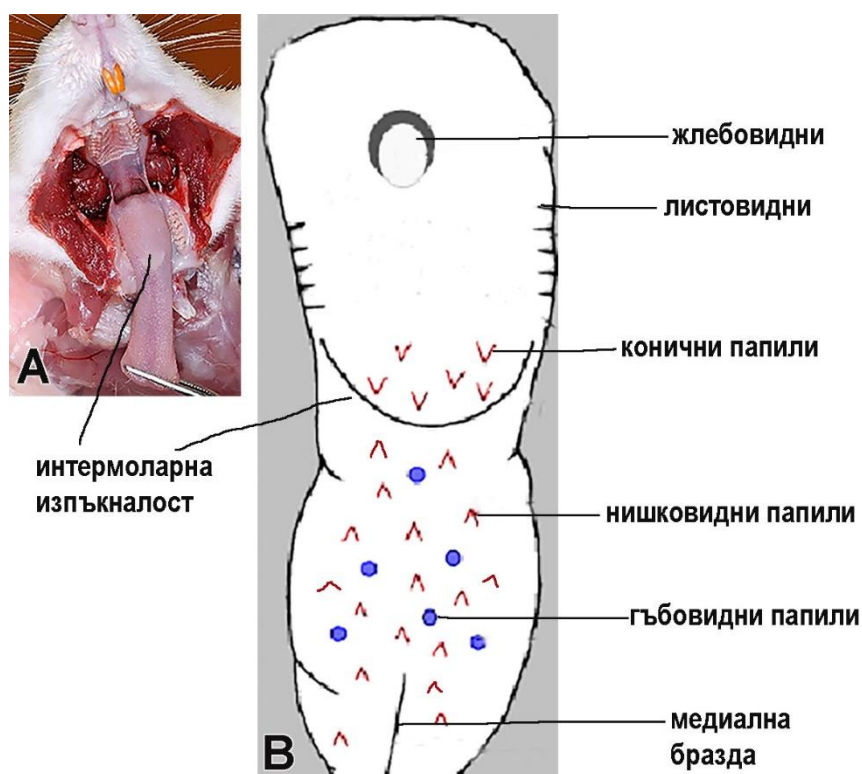
3. Измиване на срезове 2 x 5 мин.

- 3.1 Промиване на срезовеите за доказване на триптаза с EnVision Flex Wash Buffer (DM) на Dako.
  - 3.2 Промиване на срезовеите за доказване на серотонин с 0.01M PBS с pH = 7.4 (фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид).
  4. Блокиране на ендогенната пероксидаза.
    - 4.1 При срезовеите за доказване на триптаза сме използвали Peroxidase – Blocking Reagent SM801 за 5 мин.
    - 4.2 При срезовеите за доказване на серотонин сме използвали 1.2% водороден пероксид в абсолютен метанол в продължение на 30 min. на стайна температура.
  5. Измиване на срезовеите 3 x 5 мин.
  6. Преинкубиране на срезовеите за доказване на серотонин с 0.01 M PBS, съдържащ 5% нормален кози серум за 1 час на стайна температура за редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване.
  7. Накапване на първичното анти тяло и инкубация във влажна камера при 4°C за 24 часа.
    - 7.1 FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase Клон AA1, Ready to Use на Dako за доказване на триптаза.
    - 7.2 За доказване на серотонин сме използвали anti-Serotonin анти тяло (S5545 на Sigma-Aldrich в работно разреждане 1:2000).
  8. Измиване на срезовеите 3 x 5 min
    - 8.1 Промиване на срезовеите за доказване на триптаза с EnVision Flex Wash Buffer (DM) на Dako.
    - 8.2 Промиване на срезовеите за доказване на серотонин с 0.01M PBS с pH = 7.4 (фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид).
  9. Инкубация с второто (мостово) анти тяло.
    - 9.1 EnVision Flex/HRP SM802, Ready to Use на Dako за 40 min.
- Биотинилиран антизаешки IgG, произведен в коза (Sigma Aldrich) в 3% нормален кози серум в 0.01M PBS (работно разреждане 1:250). Инкубацията с второто анти тяло за доказване на серотонин се извърши в продължение на 1 h на стайна температура.
10. Измиване на срезовеите 3 x 5 min.
  11. Инкубация на срезовеите за доказване на серотонин в ABC комплекс (*Vector Laboratories*). Времето за инкубация е 1 h във влажна камера на стайна температура. Инкубационният разтвор се приготвя 30 min преди употреба (6.26 µl A+6.26 µl B в 1 ml 0.01M PBS).
  12. Измиване на срезовеите 3 x 5 min.
  13. Визуализиране на реакциите от 5 до 15 min на тъмно с помощта на 3,3'-диаминобензидин тетраhydroхлорид (DAB).
  14. Измиване на срезовеите с чешмяна вода, за да спрем реакцията на DAB.
  15. Измиване на срезовеите с дестилирана вода.
  16. Следва преминаване на срезовеите през възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан.

## IV. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Нормален морфологичен строеж на език

В резултат от проведените изследвания установихме, че езикът при плъховете Wistar е добре развит мускулист орган, който има удължена форма в ростро-каудалната посока (Фиг. 1А, В). Интермоларната изпъкналост е най-широката част на езика, разположена между корена и тялото на езика (Фиг. 1А, В). Медиалната бразда се простира от върха до средата на гърба на езика (Fig. 1В).

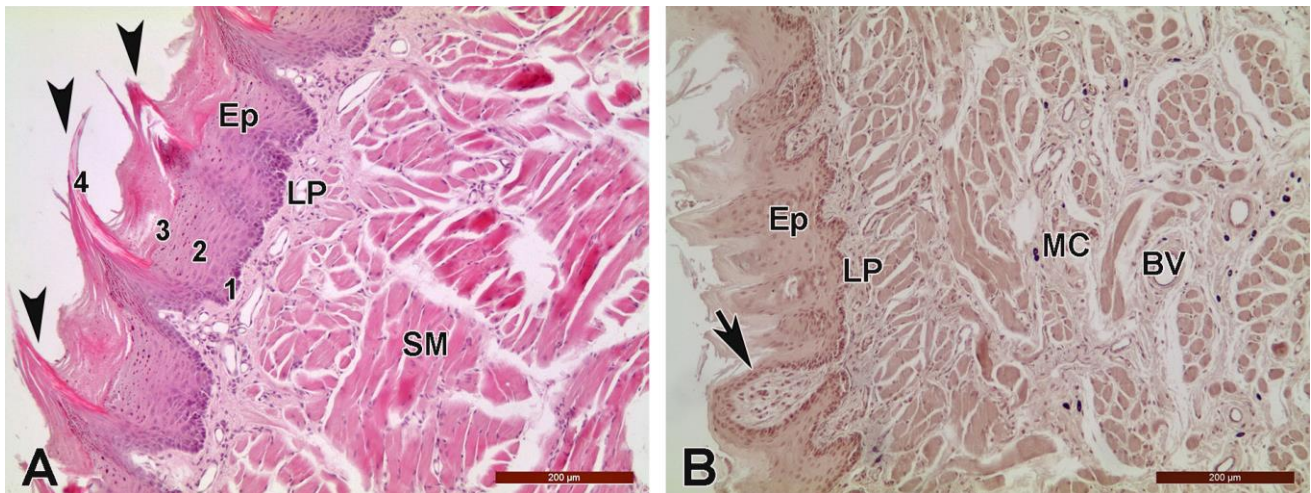


**Фигура 1.** Схематично представяне на езика на плъх с означена медиална бразда, интермоларна изпъкналост и разположението на папилите по дорзалната повърхност на езика при плъх.

Наблюдаваните изходящи канали на жлези са разположени в областта на корена на езика. Езиковата юздичка (*frenulum linguae*) се наблюдава като лигавична гънка, която свързва езика с пода на устната кухина и се локализира в средата на зоната между върха и тялото от вентралната повърхност на езика. Лигавицата покрива дорзалната, вентралната и страничните повърхности на езика. Характеризира се с неравномерна повърхност върху гръбната (дорзалната) повърхност на езика и формирането на специфични образувания (папили) които имат сходна структура, но се различават по форма и размер (Фиг. 1А, В).

Дорзалната повърхност на езика е покрита частично от многослоен плосък вроговяващ епител (Ер) (Фиг. 2А, В). Под епитела се разполага собствената

пластинка (*lamina propria*, LP), която е отделена от епитела чрез базална мембрана. *Lamina propria* е представена от рехавява съединителна тъкан, в която се включват множество кръвоносни съдове и нервни влакна (Фиг. 2А, В).



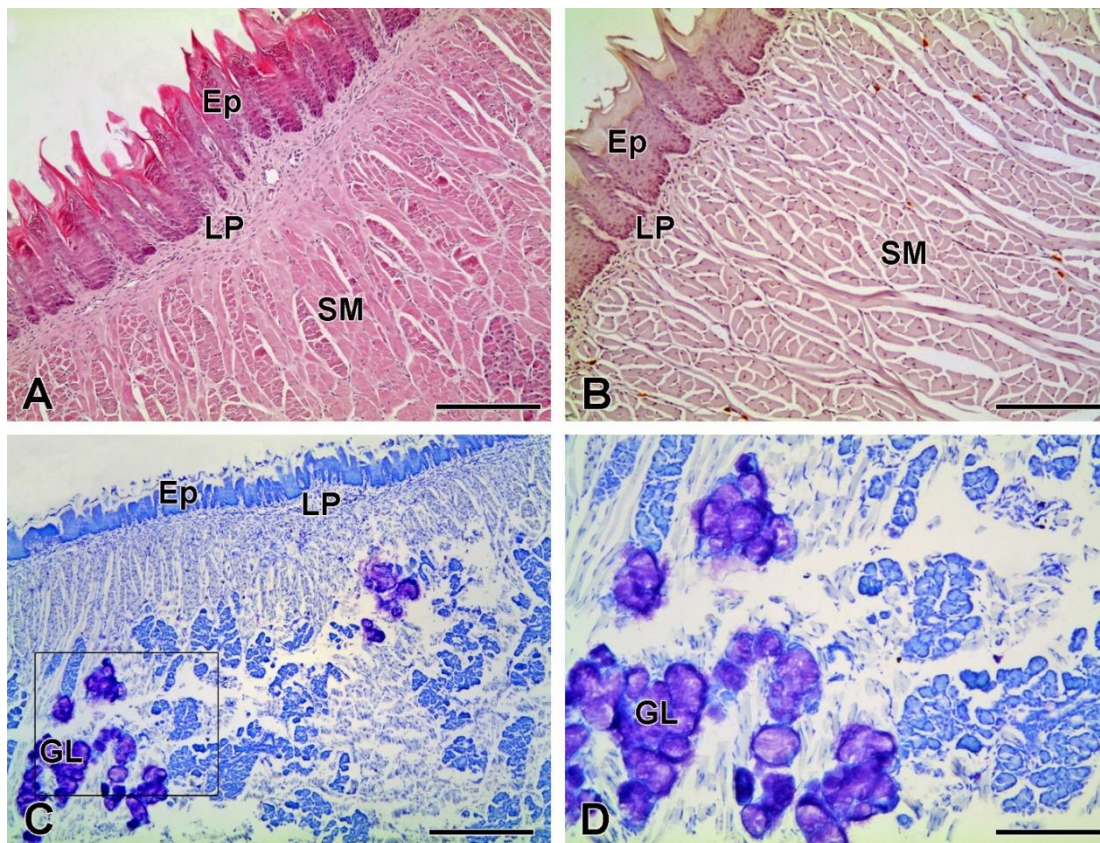
**Фигура 2.** Микрофотографии от дорзалната повърхност на езика при плъх оцветени с хематоксилин и еозин (А) орцейн и толуидиново синьо (В). (А) Епителът е изграден от четири слоя: базален (1), шипест (2), гранулозен (3) и рогов слой (4). С връх на стрела са означени нишковидни папили (А), а със стрела е показана гъбовидна папила (В). Ep – епител, LP – собствена пластинка (*lamina propria*), SM – напречно набраздена мускулна тъкан, MC – мастоцити, BV – кръвоносни съдове. Мащабна скала = 200 µm.

Епителът се състои от четири слоя: базален, шипест, гранулозен и рогов слой (Фиг. 2А; 3). Базалният слой включва епителни клетки с призматична или кубична форма, които са разположени перпендикулярно на базалната мембрана (Фиг. 2А; 3). Те имат овални хиперхромни ядра и базофилна цитоплазма (Фиг. 2А; 3). Шипестият слой е представен от няколко реда големи клетки с неправилна многоъгълна форма, които контактуват помежду си с помощта на израстъци под формата на шипове. С приближаване към гранулозния слой, епителните клетки издължават формата си и се разполагат успоредно на повърхността на епитела (Фиг. 2А; 3). Гранулозният слой се образува от няколко реда клетки с голяма овална форма и гранулирана цитоплазма. Клетките на гранулозния слой се подлагат на доста по-изразени промени: те стават по-плътни и плоски. Най-повърхностно разположен е роговият слой (Фиг. 2А; 3) който се образува от плоски безядрени клетки.

По дорзалната повърхност на езика се наблюдава наличие на голям брой папили, които са различни по размер, форма и локализация. Нишковидните папили са съсредоточени на върха, дорзалната и страничните повърхности на езика (Фиг. 1В; 2А). Те имат тънка, удължена форма със заострени и заоблени върхове. Гъбовидни папили приличат на куполообразна структура и се разполагат по дорзалната, страничните повърхности и около медиалната бразда на езика (Фиг. 1В; 2В).

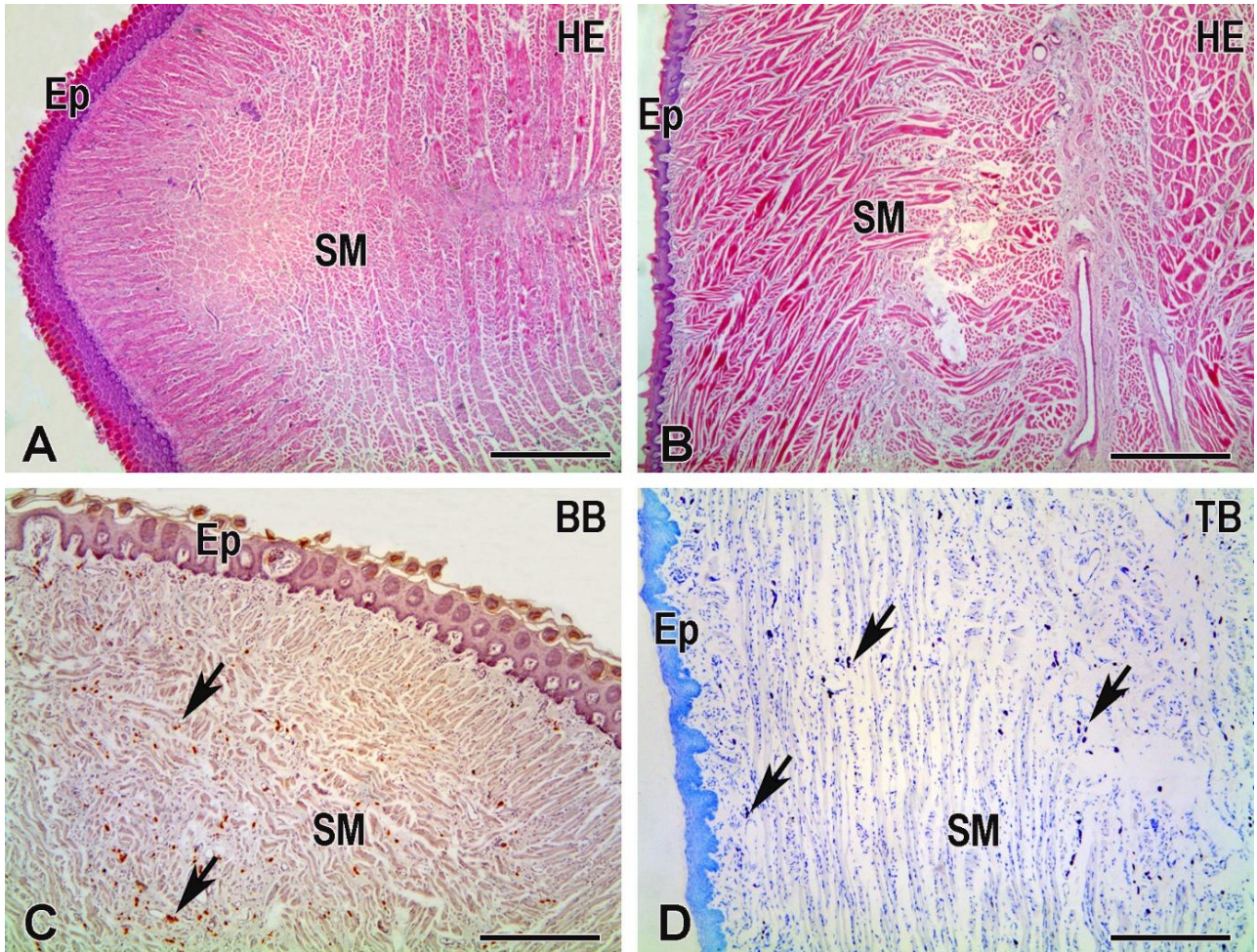


**Фигура 3.** Оцветяване по Ван Гизон, визуализиращо съединителната тъкан в *lamina propria* (LP) в език от плъх. Епителът е изграден от четири слоя: базален (1), шипест (2), гранулозен (3) и рогов слой (4). Ep – епител, SM – напречно набраздена мускулна тъкан, BV – кръвоносни съдове. Мащабна скала = 100 μm.



**Фигура 4.** Фронтални срезове на езика оцветени с хематоксилин и еозин (A), Бисмарк Браун и орцеин (B), Толуидиново синьо (C, D). Ep – епител, LP – собствена пластинка (*lamina propria*), SM – напречно набраздена мускулна тъкан, GL – жлези. Мащабна скала = 200 μm (A, B), 500 μm (C), 100 μm (D).

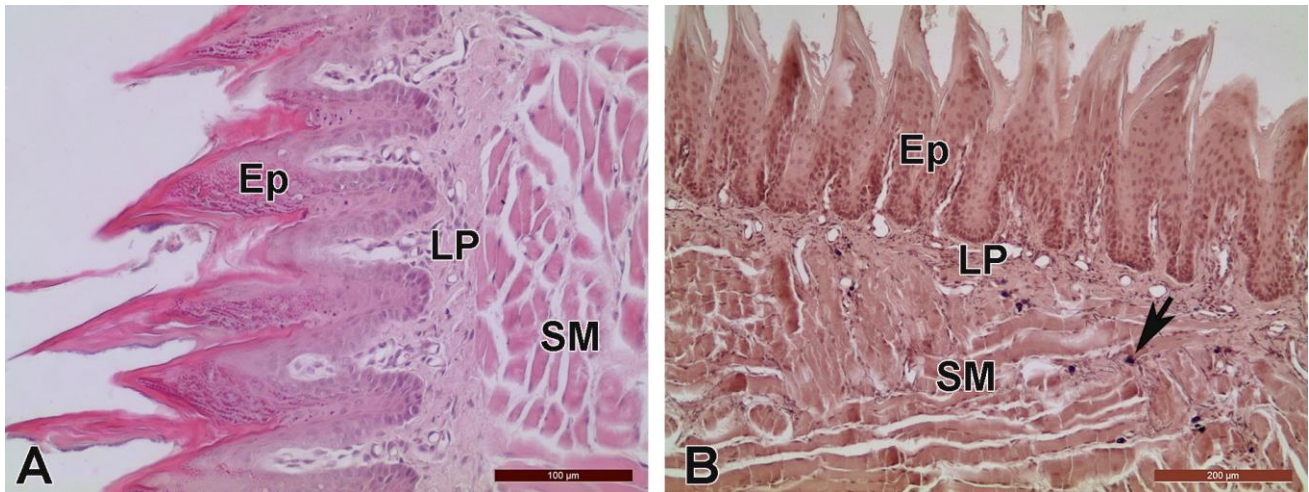
За да изследваме, в детайли, морфологията на езика направихме срезове във фронталната (Фиг. 4), хоризонталната (Фиг. 5) и сагиталната равнина (Фиг. 6) около центъра на тялото на езика. Сагиталните срезове предоставят най-голяма площ за проучване на единичен срез, както и са по-подходящи от другите срезове за проследяване на акупунктурния канал при иглоубождане на езика. Използваните оцветявания добре визуализираха мастоцитите, кръвоносните съдове и мускулатурата.



**Фигура 5.** Хоризонтални срезове от езика на плъх оцветени с (A, B) хематоксилин и еозин (HE), (C) Бисмарк браун (BB) и (D) толуидиново синьо (TB). Ep – епител, SM – напречно набраздена мускулна тъкан. Със стрелка са означени мастоцити. Мащабна скала = 500  $\mu$ m

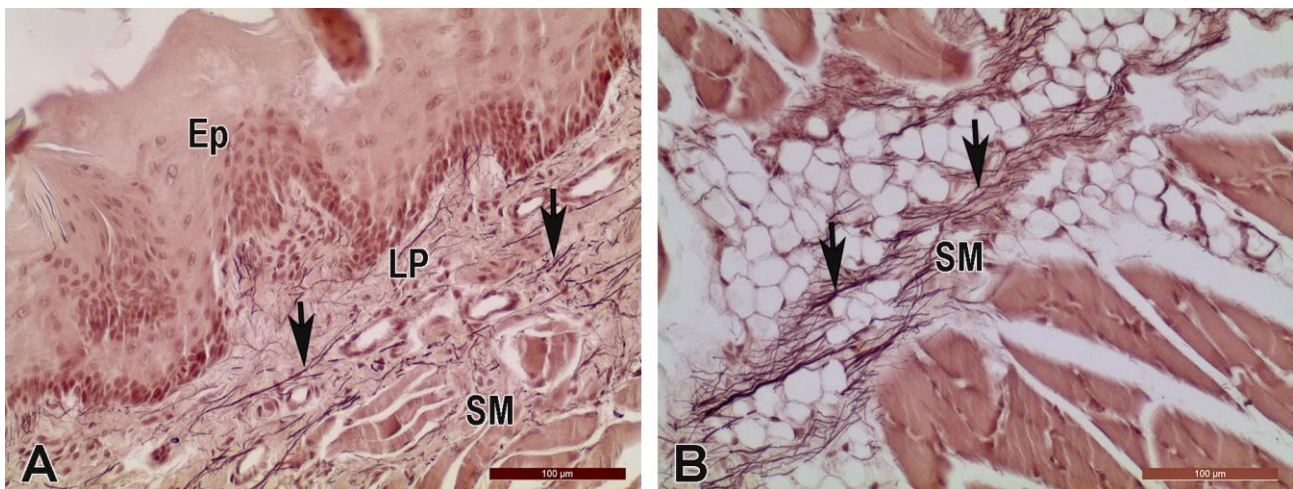
В някои участъци на лигавичният слой установяваме леки разлики в дебелината на епитела. Добре се наблюдаваха нишковидните и гъбовидните папили, както и разположените под тях вкусови луковици.

Под *lamina propria* по-дълбоко се разполага фасцията и епимизиумът (*epimysium*) на собствените мускули на езика, оформен като апоневроза, както и езиковата преграда (*septum linguae*), продължаваща в подезичната мембрана.



**Фигура 6.** Сагитални срезове от език оцветени с хематоксилин и еозин (А) и с орцеин и Бисмарк браун (В). Ep – епител, LP – lamina propria, SM – напречно набраздена мускулна тъкан. Със стрелка са означени мастоцити. Мащабна скала = 100 μm(А), 200 μm (В).

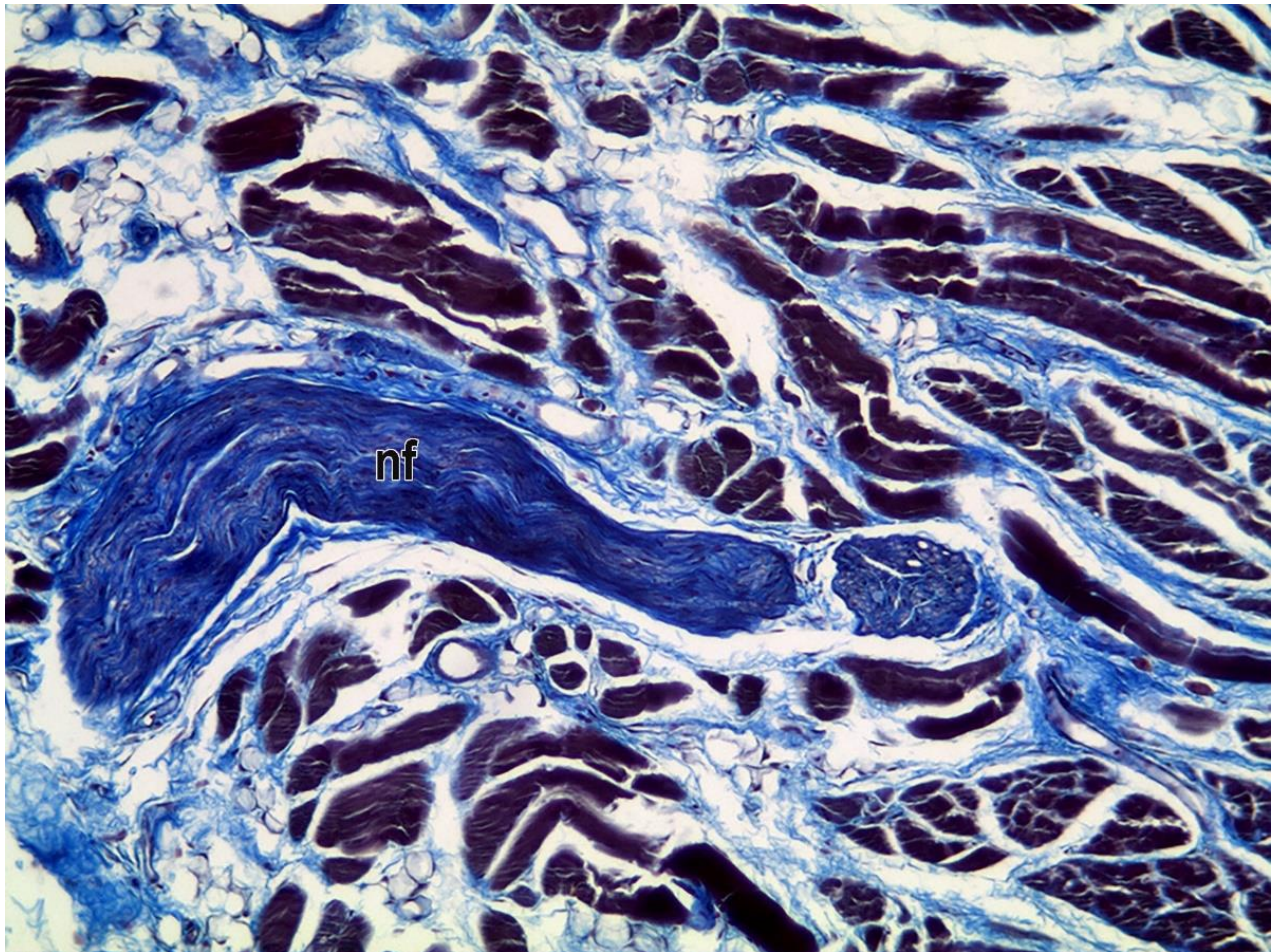
Всички изброени структурите могат да реагират при акупунктура на езика. Струпвания на еластични влакна откриваме в собствената пластинка, около слюнчените жлези и фасцията. Еластичните влакна много добре се визуализират с оцветяване с орцеин (Фиг. 7А, В)



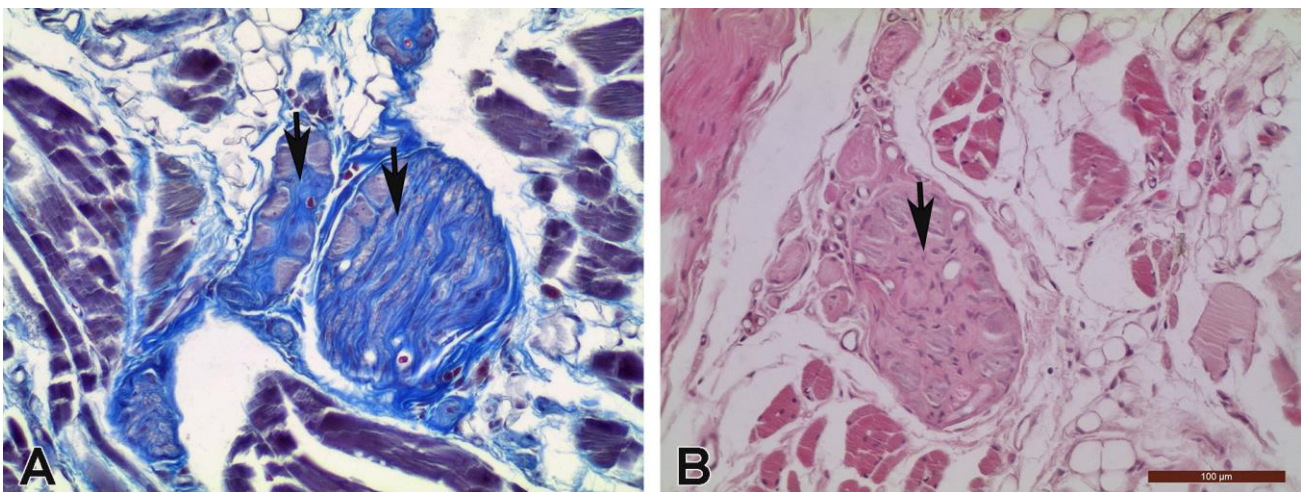
**Фигура 7.** Микрофотографии от език оцветени с орцеин (А, В) за визуализиране на еластичните влакна в lamina propria (А) и сред мускулатурата (В). Ep – епител, LP – lamina propria, SM – напречно набраздена мускулна тъкан. Със стрелка са означени еластични влакна. Мащабна скала = 100 μm

Сред мускулатурата, заобиколени от прилежаща съединителна тъкан, се визуализират надлъжно (Фиг. 8) или напречно прерязани нервни влакна. Дори с класическите хистологични техники е възможно да се наблюдава наличие на напречно прерязани ганглий (Фиг. 9А, В).

В дълбочина сред напречно набраздената мускулатура в областта на езика се наблюдава струпване на по-големи кръвоносни съдове (Фиг. 10).

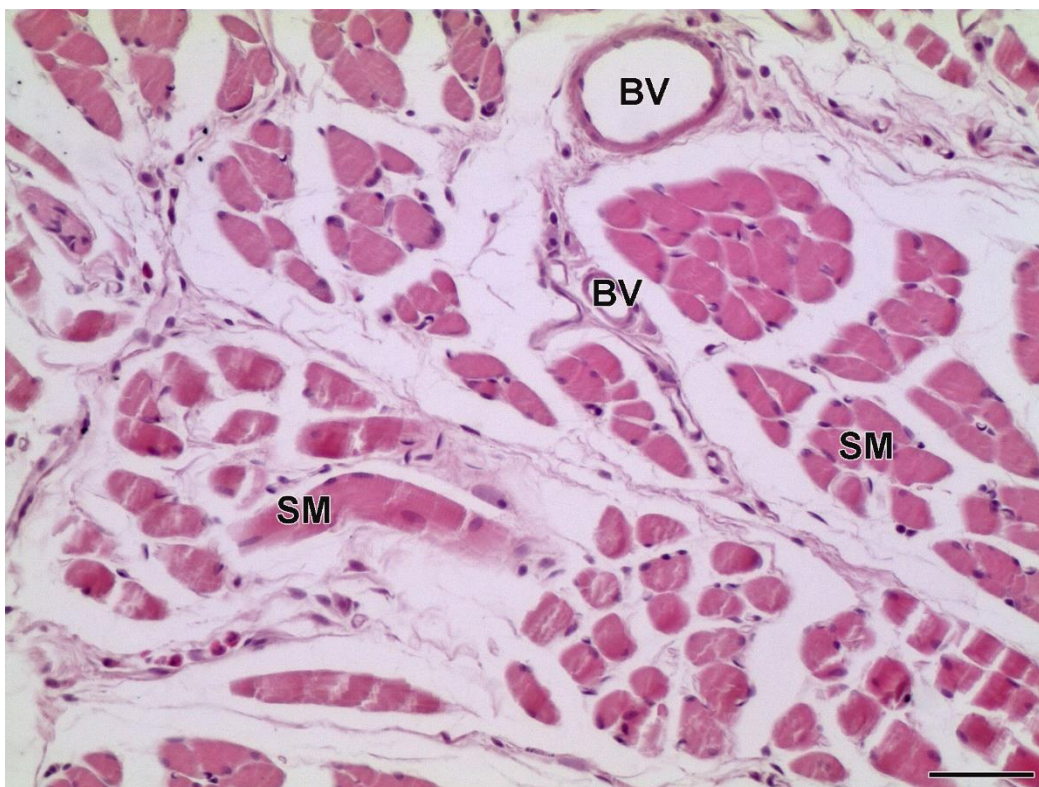


**Фигура 8.** Микрофотография от език на плъх оцветена с Азан за визуализиране на надлъжно прерязано нервно влакно (nf).

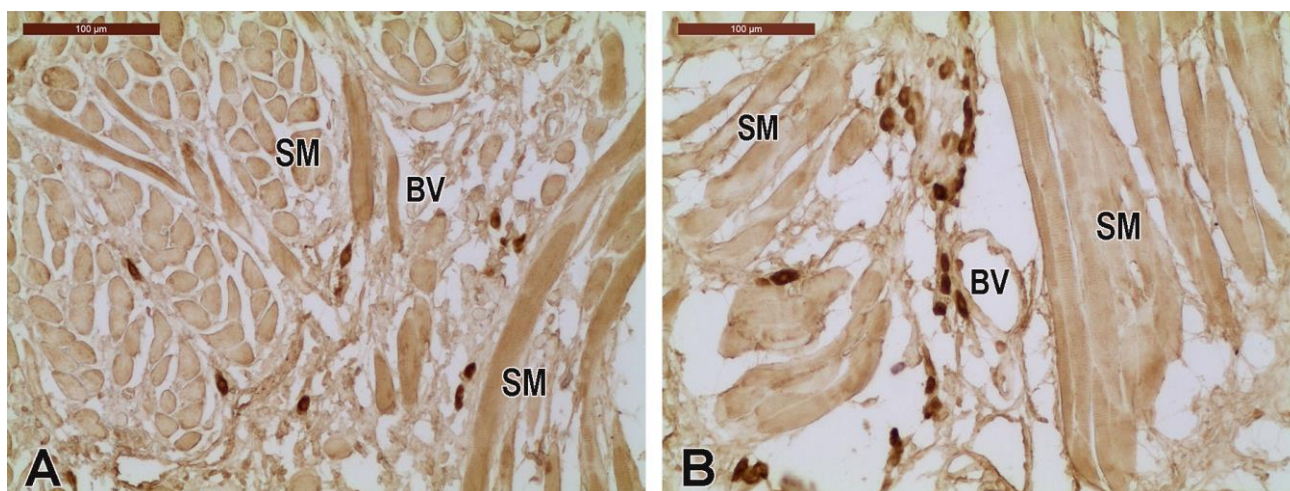


**Фигура 9.** Микрофотографии от език оцветени с Азан (А) и с хематоксилин и еозин (В). Стрелките обозначават прерязани ганглий, в които много добре се визуализират големите ганлийни клетки. Мащабна скала = 100 μm





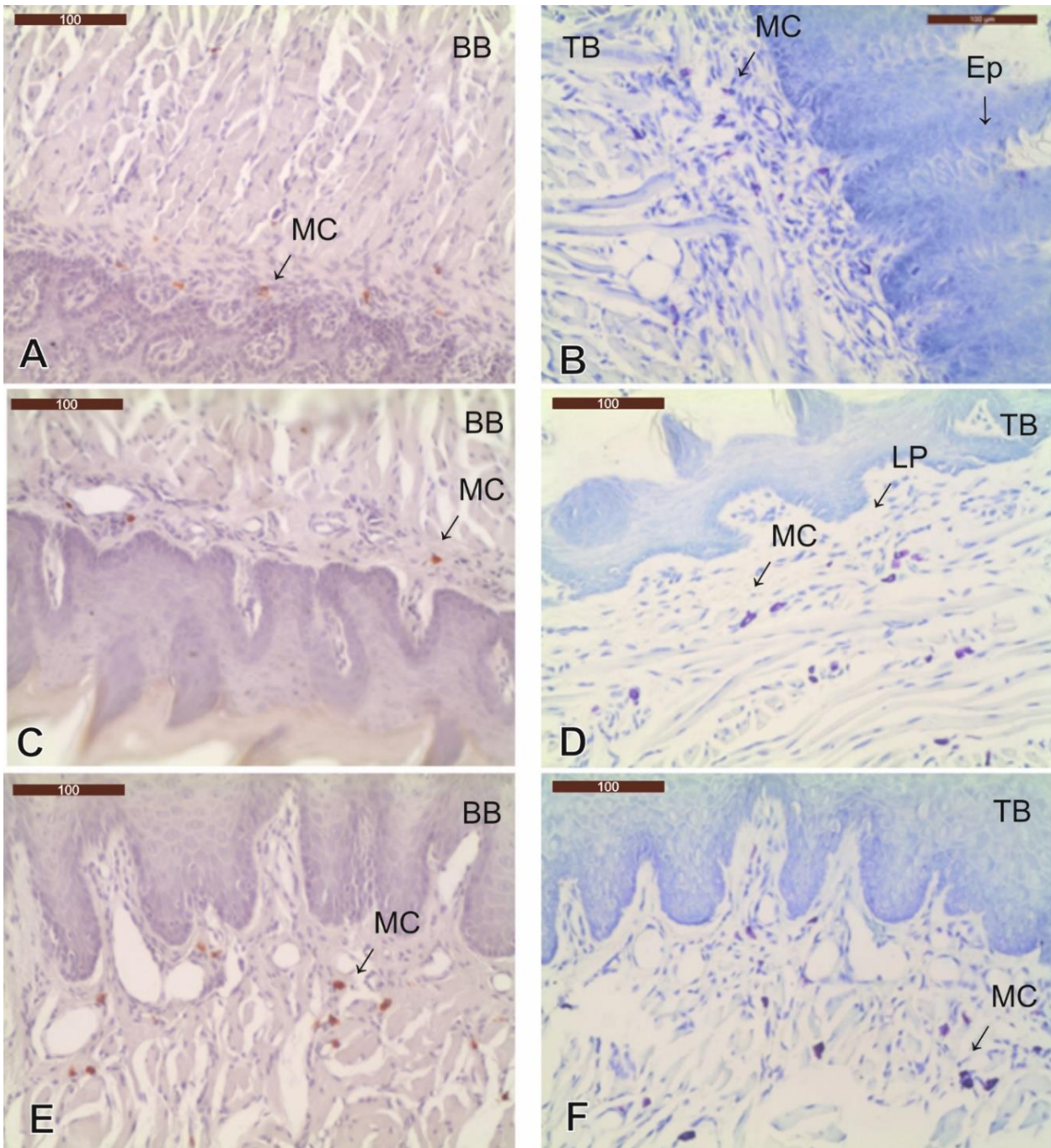
**Фигура 10.** Оцветяване с хематоксилин и еозин визуализиращо напречно набраздената мускулатура в езика и разположените сред мускулатурата кръвоносни съдове. BV – кръвоносни съдове, SM – напречно набраздена мускулна тъкан. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.



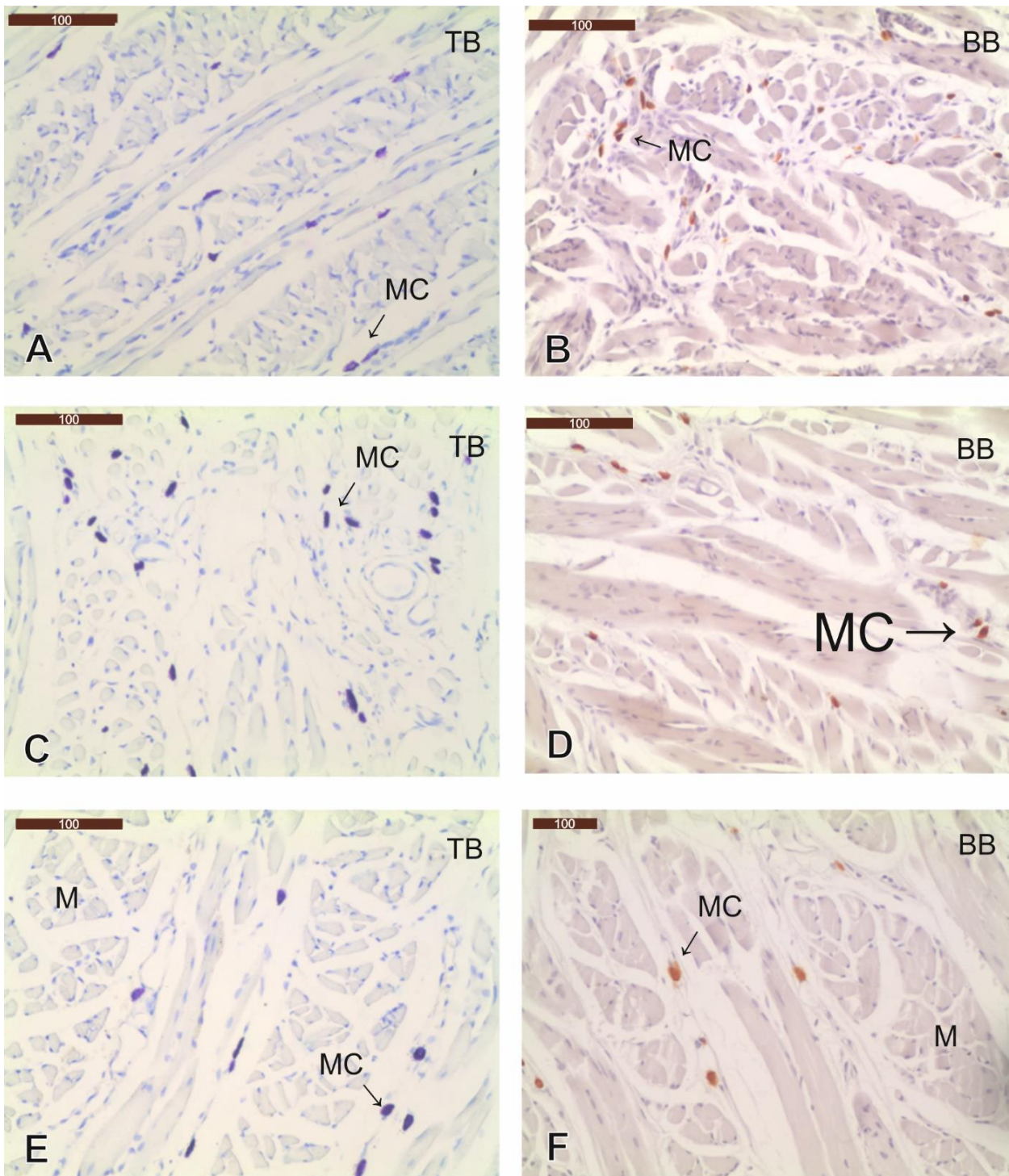
**Фигура 11.** Микрофотографии от езика на плъх, визуализиращи наличието на серотонин позитивни мастоцити, разпръснати сред снопове от напречно набраздени мускулни влакна (A) или разположени в близост до кръвоносни съдове в мускулатурата. BV – кръвоносни съдове, SM – напречно набраздена мускулна тъкан. Мащабна скала = 100  $\mu$ m.

В близост до кръвоносните съдове наблюдавахме струпване на серотонин позитивни мастоцити (Фиг. 11А, В). Тяхното разпределение е по-хомогенно в

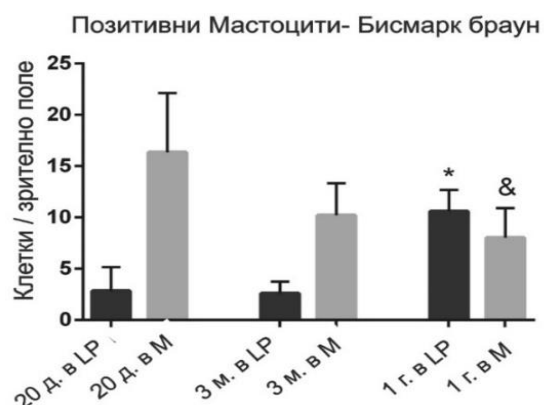
мускулатурата, докато в *lamina propria* те се разполагат в редици (Фиг. 12). Сред съединителната тъкан на напречно набраздената мускулатура мастоцитите са единично представени или групирани по няколко около нервните снопове и кръвоносните съдове (Фиг. 13).



**Фигура 12.** Микрофотографии, визуализиращи мастоцити в *lamina propria*, оцветени с Бисмарк браун (A, C, E) и толуидиново синьо (B, D, F) при 20 дневни (A, B), 3 месечни (C, D) и 1 годишни (E, F) езици от плъхове Wistar. Ep – епител, LP – *lamina propria*, MC – мастоцити. Мащабна скала = 100 μm.



**Фигура 13.** Мастоцити сред напречно набраздената мускулатура, оцветени с толуидиново синьо (A, C, E) и Бисмарк браун (B, D, F) при 20 днешни (A, B), 3 месечни (C, D) и 1 годишни (E, F) езици от плъхове Wistar. MC – мастоцити, M – напречно набраздена мускулатура. Мащабна скала = 100  $\mu$ m

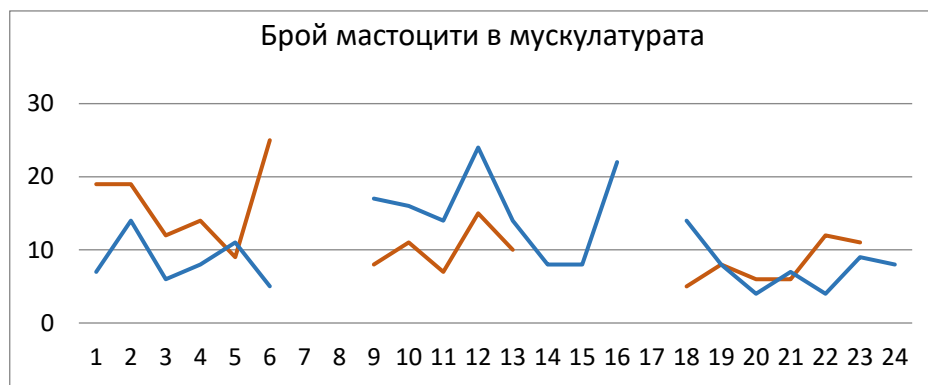


**Фигура 14.** Стълбчеста диаграма, представяща разпределението на мастоцитите в *lamina propria* и напречно набраздената мускулатура при 20 дневни, 3 месечни и 1 годишни плъхове (данните са само от анализ при оцветяване по метода на Bismarck Brown). Статистическият анализ е извършен чрез еднофакторен анализ (ANOVA) последван от пост-хок тест на Turkey за множество сравнения. \* $p < 0,01$  (спрямо 3 месечни); & $p < 0,01$  (спрямо 20 дневни).

Разпределението на мастоцитите, в езика на плъх, е различно между плъхове на възраст 20 дни, 3 месеца и 1 година. При плъхове на 20 дни и 3 месеца наблюдавахме повече мастоцити разположени в дълбокия мускулен слой на езика в сравнение с *lamina propria*.

**Таблица 1.** Среден брой мастоцити (MCs) при различни възрасти (20 дневни, 3 месечни, 12 месечни) и слоеве (*lamina propria* и мускулен слой) с оцветявания (Toluidine blue и Bismarck Brown).

Брой мастоцити в едно зрително поле, увеличение X20							
оцветяване	Бисмарк Браун (Bismarck Brown, BB)		Толуидиново синьо (Toluidine blue, TB)		средно в lamina propria	средно в мускулатурата	общо средно
	Lamina propria	Мускулатура	Lamina propria	мускулатура			
възраст↓							
20 дни	2,8		7,4		5,1		
		16,3		8,5		12,4	8,7
3 месеца	2,6		5,2		3,9		
		10,2		15,3		12,7	8,3
1 година	10,6		6,5		8,5		
		8		7,7		7,8	8,2
среден брой мастоцити в едно зрително поле, увеличение X20							8,4



**Фигура 15.** Графично представяне на разпределението на мастоцитите в lamina propria, напречно набраздената мускулатура и средния брой мастоцити на зрително поле при 20 дневни, 3 месечни и 1 годишни пълхове.

Разпределението и гъстотата на мастоцитите при 1-годишни пълхове е сходно в lamina propria и в мускулните слоеве (Фиг. 14). Средният брой мастоцити на зрително поле е около 8 (8,45–8,77) при всички възрасти (Таблица 1). Общият брой на мастоцитите не се променя през целия живот, той остава същият, но разпределението се променя.

Оцветяването с толуидиново синьо води до по-голяма вариабилност на броя на мастоцитите в *lamina propria* и напречно набраздената мускулатура (Таблица 1). Оцветяването с Бисмарк Браун, от друга страна, демонстрира по-надеждни резултати в сравнение с оцветяването с толуидиново синьо, главно поради получените по-последователни резултати.

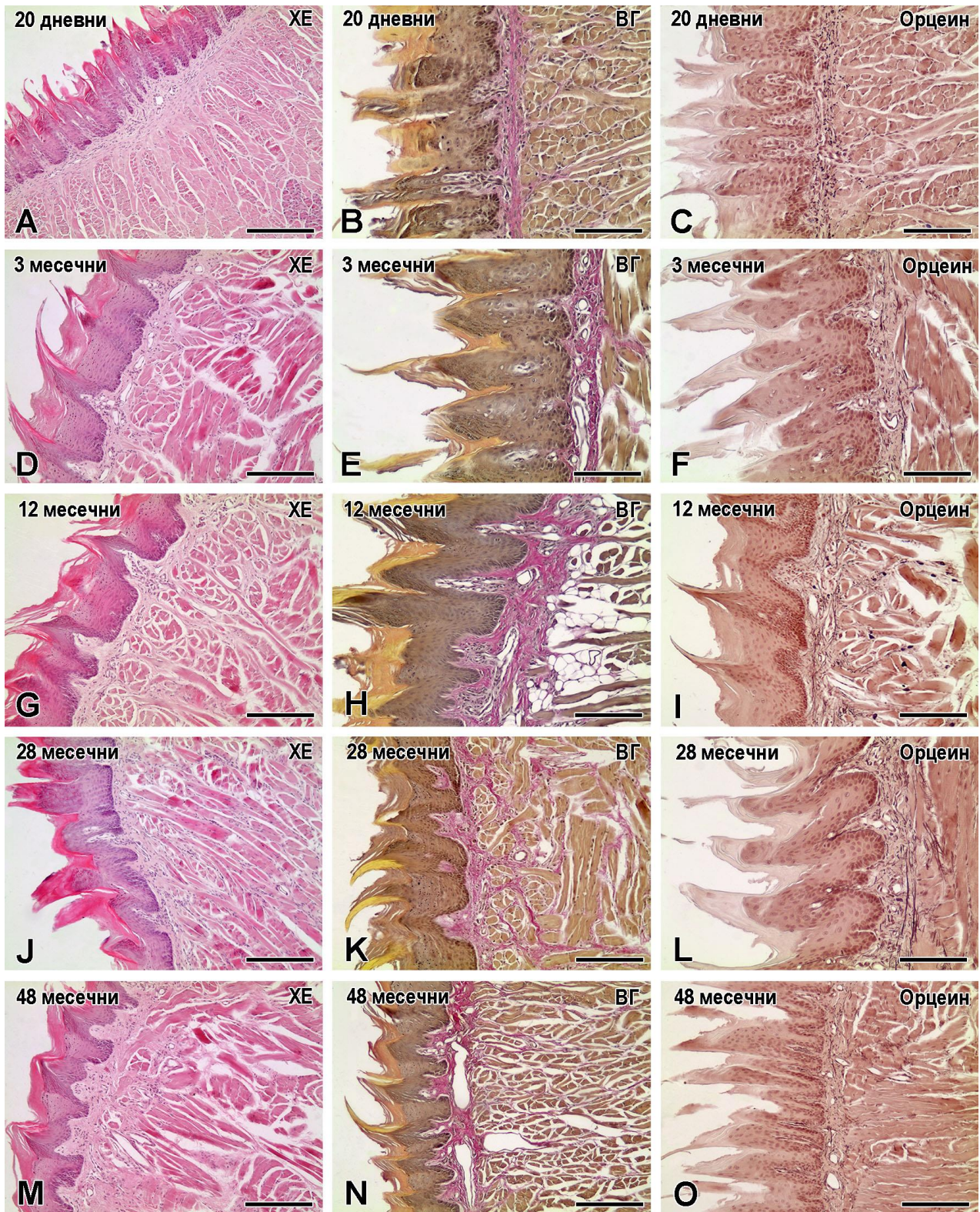
В нашите проучвания наблюдавахме хистологични промени в морфологията на езика при плъхове с напредване на възрастта. Промените са предимно в епитела, *lamina propria*, локализацията и разпределението на колагеновите и еластичните влакна в *lamina propria* (Фиг. 16).

При 20 дневните плъхове, дебелината на многослойния плосък епител и дебелината на собствената пластинка (*lamina propria*) са най-тънки (Фиг. 16А; 17; 19), докато с напредване на възрастта, дебелината на епитела достига най-голямата си стойност при 48 месечните плъхове ( $0.317 \pm 0.046$ ) (Фиг. 16М, N; 17), а дебелината на *lamina propria* е най-забележима при 12 месечните плъхове ( $0.059 \pm 0.011$ ) (Фиг. 16G, H; 19). При 12 месечните ( $0.266 \pm 0.036$ ) и 28 месечните животни ( $0.269 \pm 0.038$ ) се наблюдава известно изтъняване на епитела спрямо 48 месечните плъхове (Фиг. 17). Папилите локализирани по дорзалната повърхност на езика не са толкова добре оформени при възрастните животни, както при полово зрелите 3 месечни плъхове (Фиг. 16).

Колагенните влакна са по-изобилни сред напречно набраздената мускулатура на възрастни плъхове като се наблюдават промени в подреждането и организацията на колагенните влакна в *lamina propria* (Фиг. 16В, Е, Н, К, N). Подреждането и разпределението на еластичните и колагеновите влакна са нарушени в *lamina propria* със стареенето. Плътноста на еластичните влакна в *lamina propria* е най-ниска при 20-дневни плъхове ( $9.019 \pm 3.024$ ) (Фиг. 16В; 21), докато при 12-месечни плъхове достигат тяхната най-висока плътност ( $21.380 \pm 7.176$ ) (Фиг. 16Н; 21) и след това отново намалява с възрастта. Броят на мастоцитите на единица площ от  $1 \text{ mm}^2$  е най-нисък при 20-дневни плъхове ( $37.356 \pm 16.789$ ) (Фиг. 16С; 23), достигайки най-високия брой при 12-месечни плъхове ( $83.584 \pm 25.227$ ), докато с възрастта броят им остава висок (Фиг. 23; 25).

Статистическите изчисления са извършени с помощта на IBM SPSS Statistics (v.25) и значимостта се приема за достоверна при  $p < 0.05$ . Изследваните показатели, като дебелина на епитела, дебелина на *lamina propria*, гъстота на еластичните влакна и брой на мастоцитите, в петте възрастови групи, са представени като средна стойност и стандартно отклонение (Mean  $\pm$  SD).

Проверката за нормално разпределение на наблюденията по групи се реализираше с помощта на Shapiro-Wilk Test. В 6 от всички 20 тествани групи, разпределението се отклоняваше статистически значимо от нормалното. При обем на извадката от 30 случая, нарушаването на това условие за прилагането на Дисперсионен анализ се пренебрегва. Проверката за влиянието на възрастта върху всеки от изследваните показатели е направено с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA).



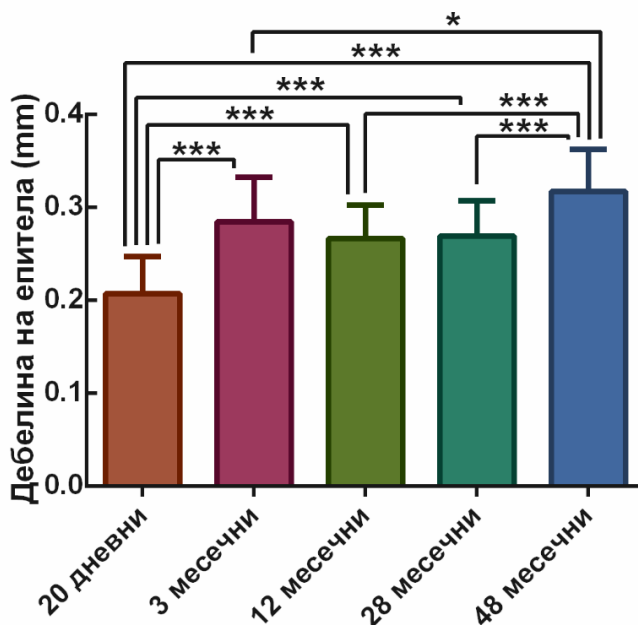
**Фигура 16.** Хистологични промени в морфологията на езика при плъхове с напредване на възрастта. Микрофотографии от дорзалната повърхност на език при плъхове, оцветени с хематоксилин и еозин (HE, лява колона), Van Gieson (VG, централна колона) и Orcein (дясна колона) при 20-дневни (A-C), 3-месечни (D-F), 12-месечни (G-I), 28-месечни (J-L) и 48-месечни плъхове (M-O). Мащабна скала: 200  $\mu$ m.

Резултатите от анализа показват статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) между средните по възраст при всеки от четирите показателя.

В зависимост от наличието на равенство на дисперсиите в сравняваните групи по възраст, за подвойковото сравнение между стойностите с напредване на възрастта е приложен тест на *Bonferroni* при равни дисперсии или *Games-Howell* при неравни дисперсии. Резултатите от тези сравнения са означени в таблицата (Таблица 4), използвайки система от букви.

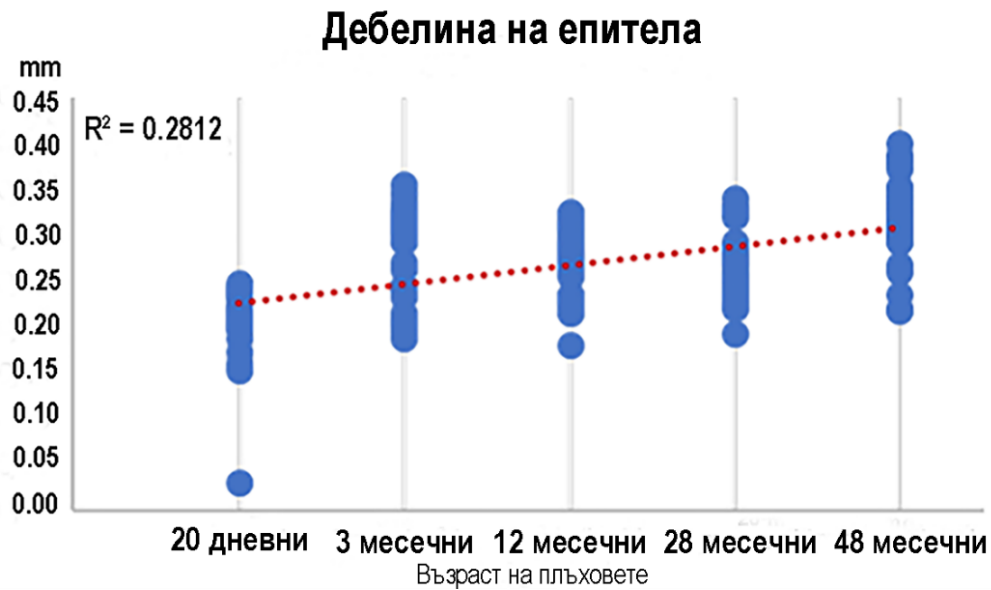
**Таблица 2.** Възрастта на плъховете, разположена в колоните, се идентифицира с азбучен ключ. За всяко подвойково сравнение със статистически значима разлика, под средната са поставени ключовете на възрастите от които, тази средна е по-голяма.

	20 дневни А	3 месечни В	12 месечни С	28 месечни D	48 месечни Е
Дебелина на епитела (mm)	0.207±0.040	0.284 ± 0.048 А	0.266±0.036 А	0.269±0.038 А	0.317±0.046 А В С D
Дебелина на <i>lamina propria</i> (mm)	0.029±0.005	0.056±0.012 А	0.059±0.011 A D E	0.048±0.017 А	0.051 ± 0.007 А
Гъстота на еластичните влакна (%)	9.019±3.024	19.541±8.258 A D E	21.380 ± 7.176 A D E	10.865±2.159	10.978±2.485
Брой на мастоцити	37.356±16.789	67.407±27.252 А	83.584±25.227 А	79.262 ± 22.101 А	79.713 ± 51.771 А

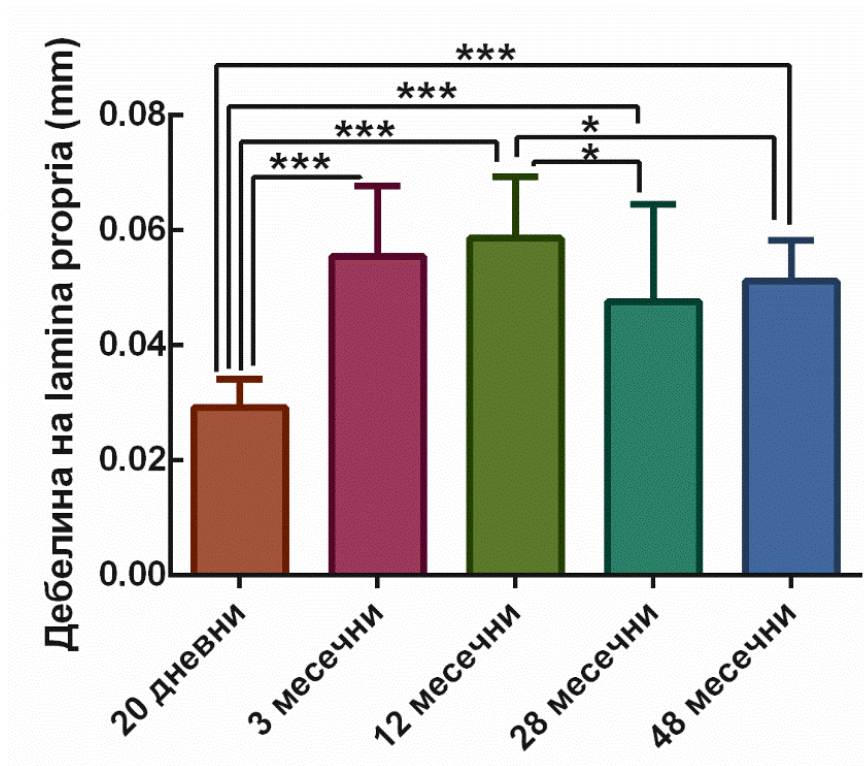


**Фигура 17.** Вертикална колонна диаграма визуализираща дебелината на епитела при 20 дневни, 3 месечни, 12 месечни, 28 месечни и 48 месечни плъхове. Проведените *post hoc* тестове, използващи корекцията на *Bonferroni*, отчитат статистически значима по-голяма дебелина на епитела при 48 месечните плъхове спрямо всички останали възрастови групи. Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение ( $Mean \pm S.D$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

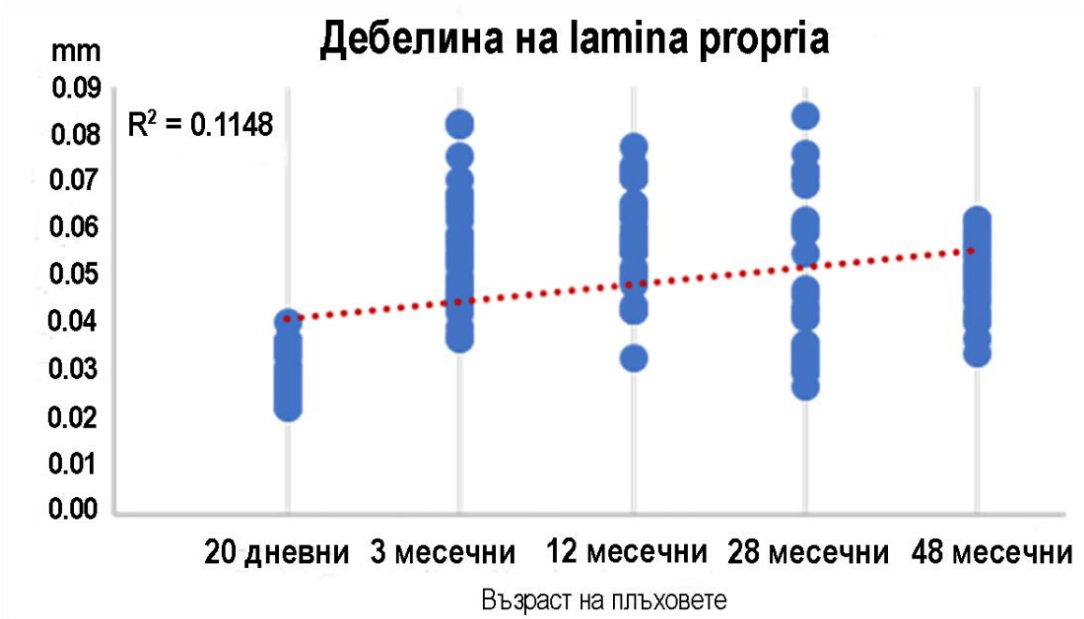




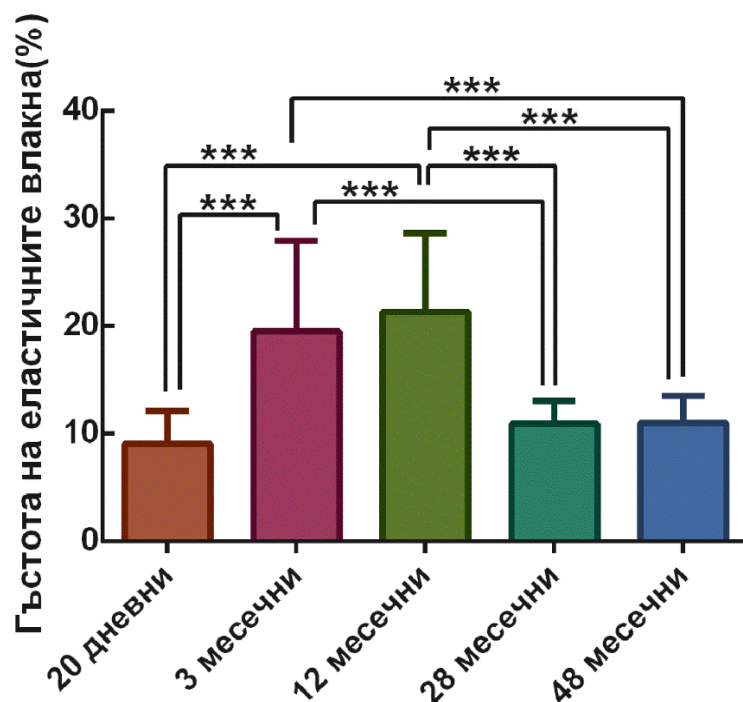
**Фигура 18.** Точкова диаграма, визуализираща силна положителна корелация на Спирман между дебелината на епитела и възрастта ( $\rho = 0.522$ ,  $p < 0.01$ ).



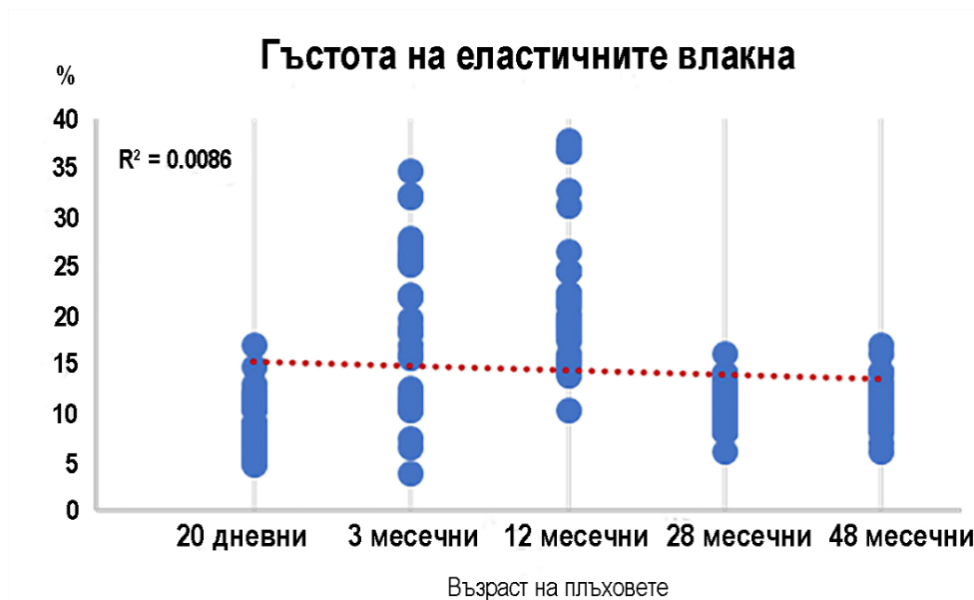
**Фигура 19.** Дебелината на собствената пластинка, lamina propria, при 20 дневни, 3 месечни, 12 месечни, 28 месечни и 48 месечни пълхове е представена графично чрез колонна диаграма. Сравненията между групите са проведени с помощта на непараметрични Games-Howell post hoc тестове. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение (Mean  $\pm$  S.D). \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



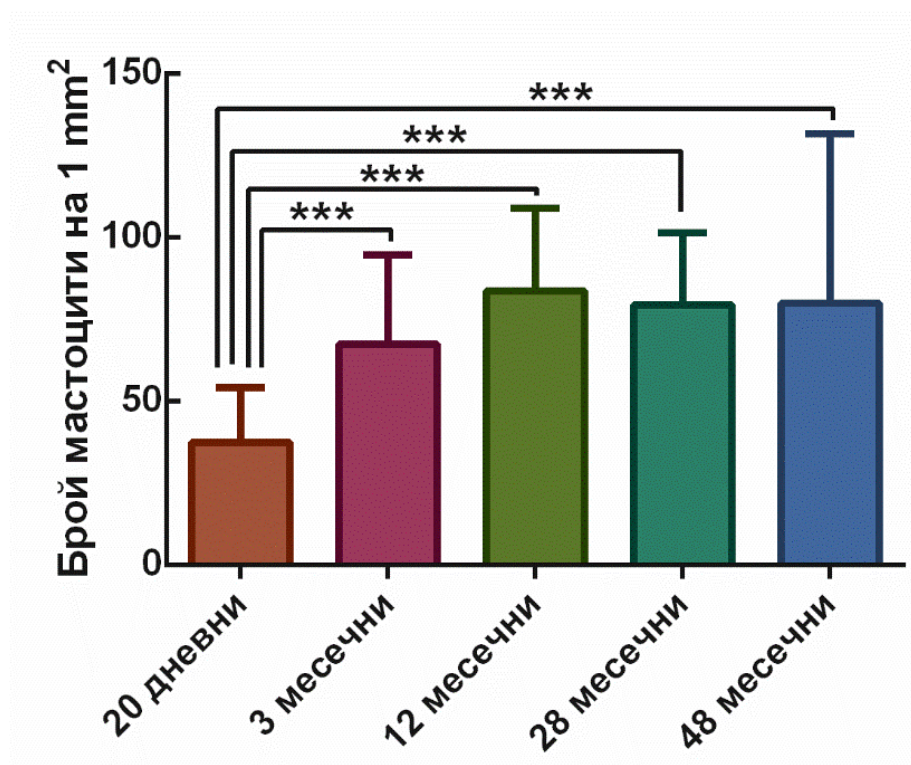
**Фигура 20.** Умерена положителна корелация, изразена чрез точкова диаграма, между дебелината на lamina propria и възрастта, анализирана по метода на Спирман ( $\rho = 0.345$ ,  $p < 0.01$ ).



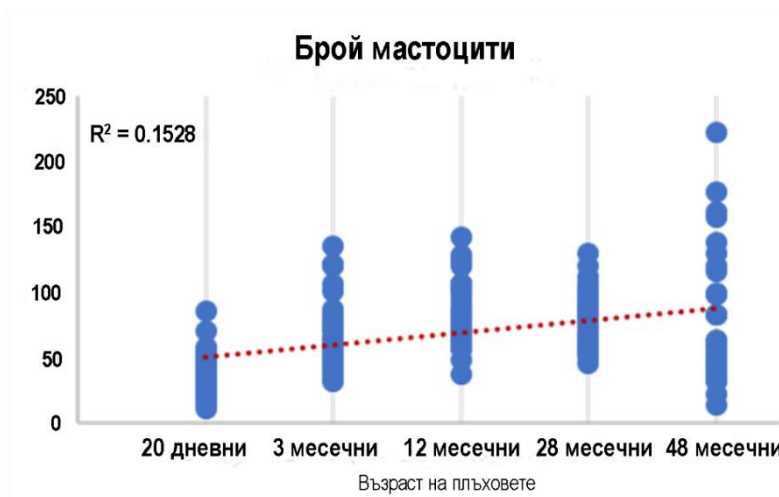
**Фигура 21.** Вертикална стълбовидна диаграма, демонстрираща гъстотата на еластичните влакна в lamina propria при 20 дневни, 3 месечни, 12 месечни, 28 месечни и 48 месечни плъхове. С помощта на непараметрични Games-Howell post hoc тестове са сравнени групите. Сравненията между групите са проведени с помощта на Данни са представени като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение (Mean  $\pm$  S.D). \*\*\* $p < 0.001$ .



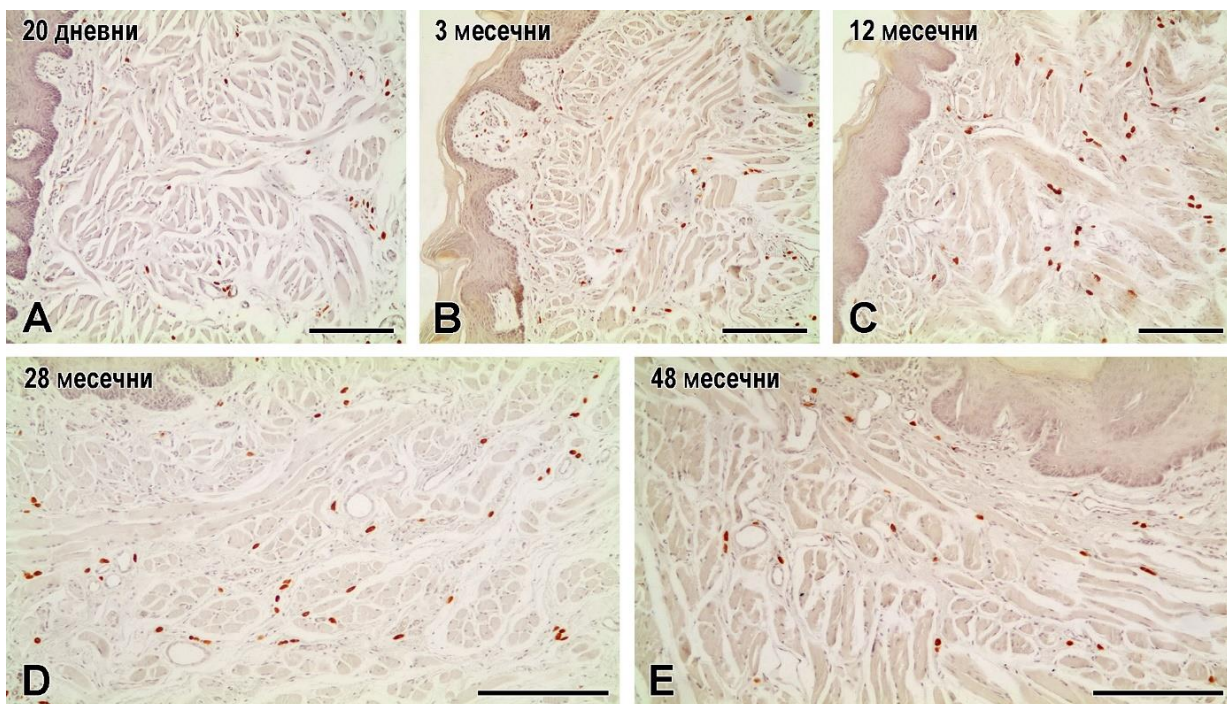
**Фигура 22.** Непараметричният корелационен анализ по метода на Спирман показва, че не се наблюдава статистически значима корелационна зависимост между гъстотата на еластичните влакна и възрастта на животните ( $\rho = -0.013$ ,  $p = 0.871$ ).



**Фигура 23.** Вертикална стълбовидна диаграма, демонстрираща броят на мастоцитите при 20 дневни, 3 месечни, 12 месечни, 28 месечни и 48 месечни пълхове. Сравненията между групите са проведени с помощта на непараметрични Games-Howell post hoc тестове. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение (Mean $\pm$ S.D). \*\*\* $p < 0.001$



**Фигура 24.** Умерена положителна корелация между броят на мастоцитите и възрастта, анализирана по метода на Спирман ( $\rho = 0.345$ ,  $p < 0.01$ ).

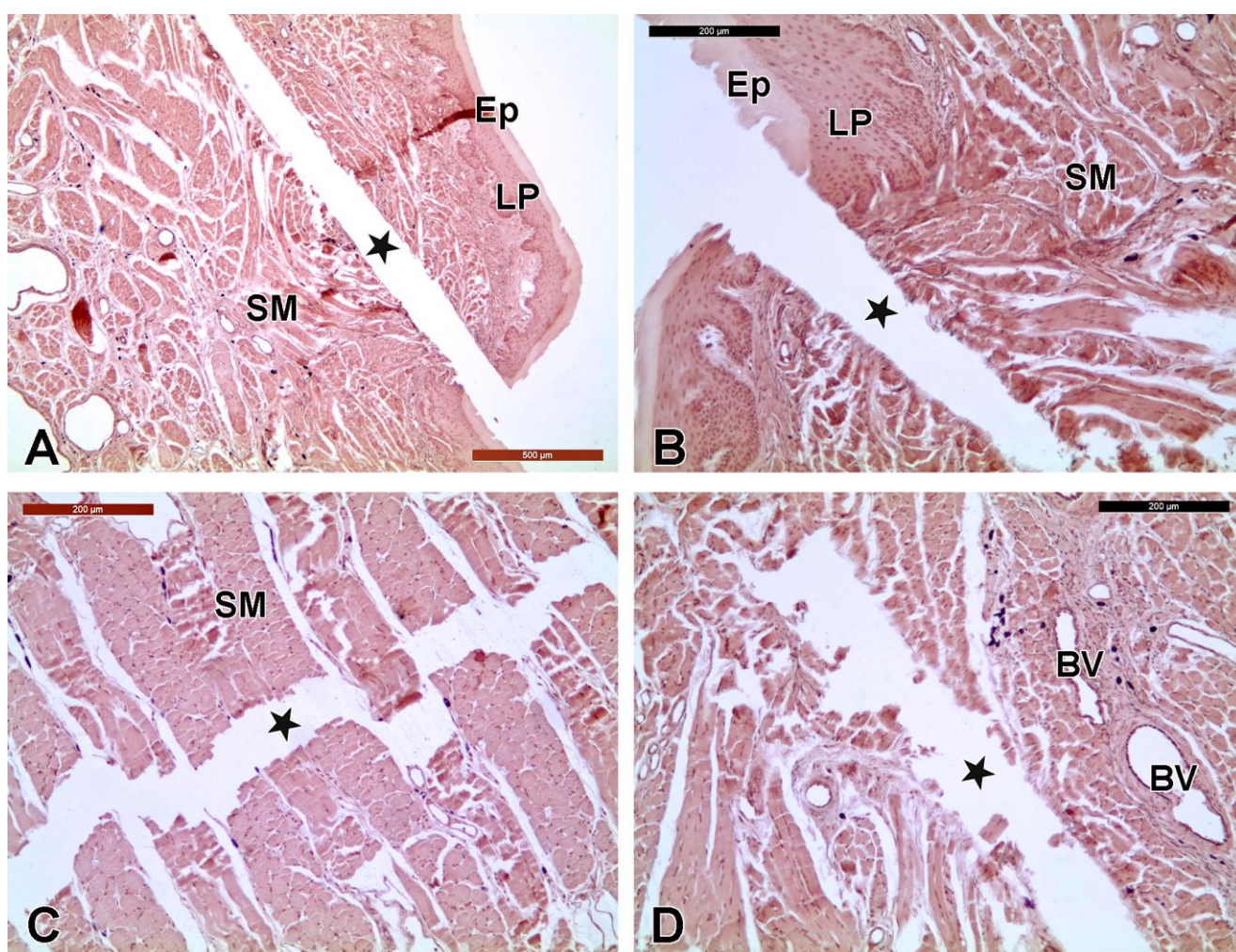


**Фигура 25.** Представителни микрофотографии оцветени с Бисмарк браун, демонстриращи разпределение на мастоцити при 20-дневни (A), 3-месечни (B), 12-месечни плъхове (C), 28-месечни плъхове (D) и 48-месечни (E) плъхове. Мащабна скала: 200  $\mu\text{m}$ .

Проведеният корелационен анализ на Спирман доказа статистически значима ( $p < 0.001$ ) умерена положителна корелация между дебелината на епитела и възрастта ( $\rho = 0.522$ ,  $p < 0.01$ ) (Фиг. 18). В допълнение към наблюдаваната взаимовръзка между дебелината на епитела и възрастта, ние установихме положителна корелация и тенденция, че с възрастта, дебелината на *lamina propria* нараства ( $\rho = 0.345$ ,  $p < 0.01$ ) (Фиг. 20), както и броят на мастоцитите ( $\rho = 0.387$ ,  $p < 0.01$ ) (Фиг. 24). С възрастта, плътността на еластичните влакна намалява, но не се наблюдава статистически значима отрицателна корелация между тези два фактора ( $\rho = -0.013$ ,  $p = 0.871$ ) (Фиг. 22).

## 4.2 Морфологични промени след експериментална акупунктура в точка Ex-HN-10 на език

При дисекции на езикът след експериментална акупунктура в акупунктурна точка Ex-HN-10 у плъх се разкрива целия ход на акупунктурната игла, която пробива епителът, *lamina propria*, и след това навлиза в дълбочина в мускулите, и излиза по долната повърхност на езикът. Наблюдавахме, че не са засегнати големи, дълбоко лежащи структури в близост до точката (клонове на *n. lingualis*, *n. hypoglossus*, *a. et v. lingualis*) и не се наблюдава кървене при поставяне на иглата. Поради своята еластичност тъканите бързо възстановяват целостта си след изваждане на акупунктурната игла, дефектът, който се получава в тях е с минимален диаметър и мястото на каналът от иглата става трудно различимо.

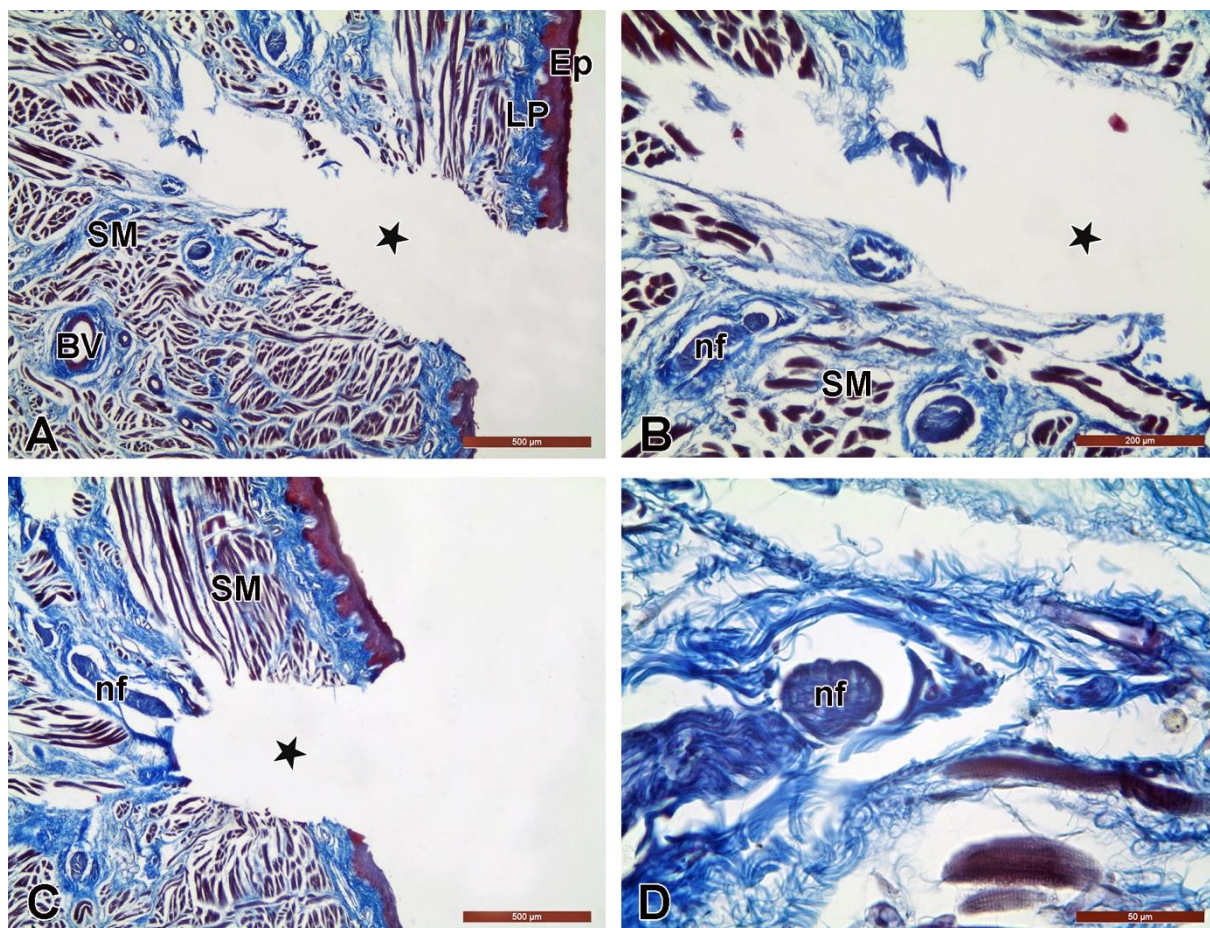


**Фигура 26.** (A-D) Микрофотографии, оцветени с Orcein, визуализиращи игления тракт, образуван след акупунктура. Наблюдават се разкъсани и разместени еластични влакна в близост до игления тракт, образуван след акупунктура. Иглен тракт (звезда), BV (кръвоносни съдове), SM (мускулатура), LP (*lamina propria*), Ep (епител). Мащабна скала = 200  $\mu\text{m}$  (B, C, D), 500  $\mu\text{m}$  (A).

За да се проследи хистологично ходът на канала и реакцията на тъканите иглата се оставяше във взетата тъканна проба и се обработваше по описана от нас технология. При тази методика наблюдаваният от нас канал се визуализира цялостно и показва точния път на иглата, както и деформацията на разположените в близост тъкани. В резултат на акупунктура на езика целостта на епитела се нарушава и той се вгъва в посока на игления тракт. Наблюдавахме уплътняване и изместване на *lamina propria* и съединителната тъкан в посока към мускулатурата (Фиг. 26; 28; 29; 30). Наблюдаваното вгъване на епителът и увеличаване на съединителна тъкан и клетки в посока на акупунктурния канал е слабо изразено. Това вероятно се дължи на по-малката подвижност на лигавицата на езикът и нейното здраво свързване с подлежащата мускулатура.



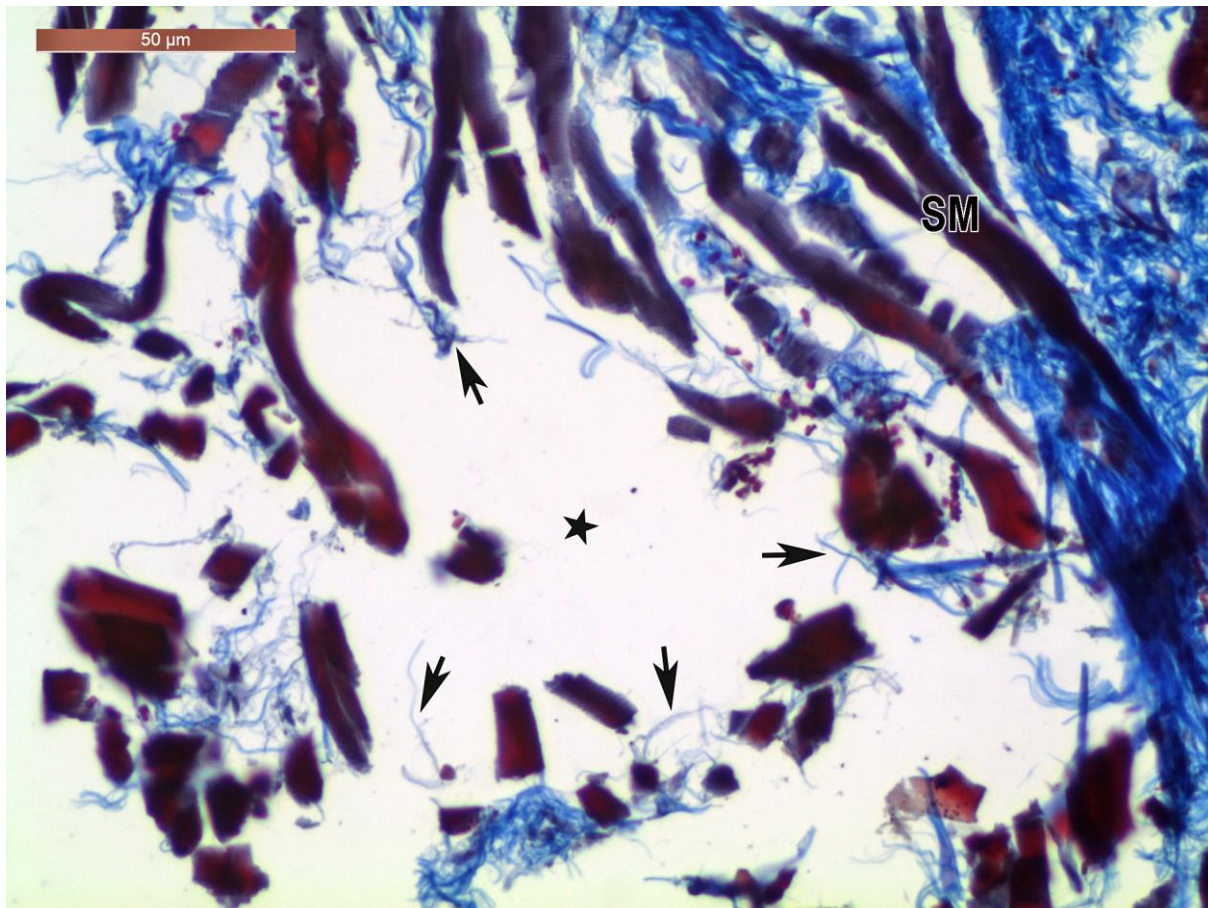
**Фигура 27.** Микрофотография, оцветена с Orcein. Разкъсани еластични влакна и мускулатура в игления тракт, образуван след акупунктура. Иглен тракт (акупунктурен канал), еластични влакна (стрелки). Вижда се парченце мускулатура (глава на стрелка) и еластични влакна в средата на игления тракт. Мащабна скала = 100 μm.



**Фигура 28.** Микрофотографии, оцветени с Azan (A, B, C, D) показващи игления тракт, образуван след акупунктура. Забелязват се разкъсани и разместени колагенни влакна в близост до игления тракт и нервни влакна (nf) с различна степен на увреждане. Иглен тракт (звезда), BV (кръвоносни съдове), SM (мускулатура), LP (lamina propria), Ep (епител). Мащабна скала = 200  $\mu\text{m}$  (B), 500  $\mu\text{m}$  (A,C), 50  $\mu\text{m}$  (D).

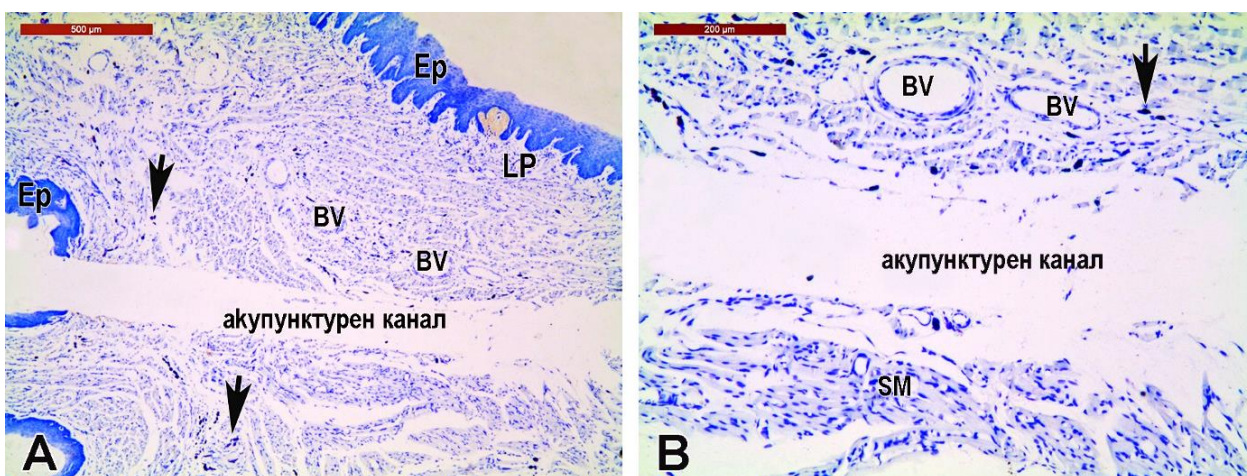
Наблюдавахме частично разрушаване на целостта на мускулатурата на езика и попадане на мускулни влакна в игления тракт. Отделни части от мускули попадат в игления канал (акупунктурен канал), образуван след акупунктура (Фиг. 26А, С, D; 27). Колагенните и еластични влакна се деформират, а някои от тях се разкъсват. Части от колагенни и еластични влакна, които са увлечени от акупунктурната игла, се виждат разкъсани в акупунктурния канал (Фиг. 27; 28А, В, D; 29; 32D).

Наблюдавахме нервни влакна в близост до игления тракт, образуван след акупунктура. Никой от тези нервни влакна не бяха засегнати от иглата (Фиг. 32Е, F), докато при други се наблюдаваха увреждания (Фиг. 28).



**Фигура 29.** Микрофотография, оцветена с Azan. Наблюдават се парченца мускулатура, единични клетки и колагенни влакна (стрелки) в игления тракт (звезда) образуван след акупунктура. Мащабна скала = 50  $\mu\text{m}$ .

Измененията в структурите на съединителната тъкан са най-ясно изразени близо до канала, образуван от акупунктурната игла, но се наблюдават деформации и в съседните участъци. Тези изменения засягат както *lamina propria*, така и съединителната тъкан разположена сред мускулатурата на езикът.



**Фигура 30.** (А, В) Микрофотографии, оцветени с толуидиново синьо. Визуализира се игления тракт (аккупунктурен канал), образуван след акупунктура. BV (кръвоносни съдове), SM (мускулатура), LP (*lamina propria*), Ep (епител), мастоцити (стрелки). Мащабна лента = 500  $\mu\text{m}$ (А), 200  $\mu\text{m}$  (В).



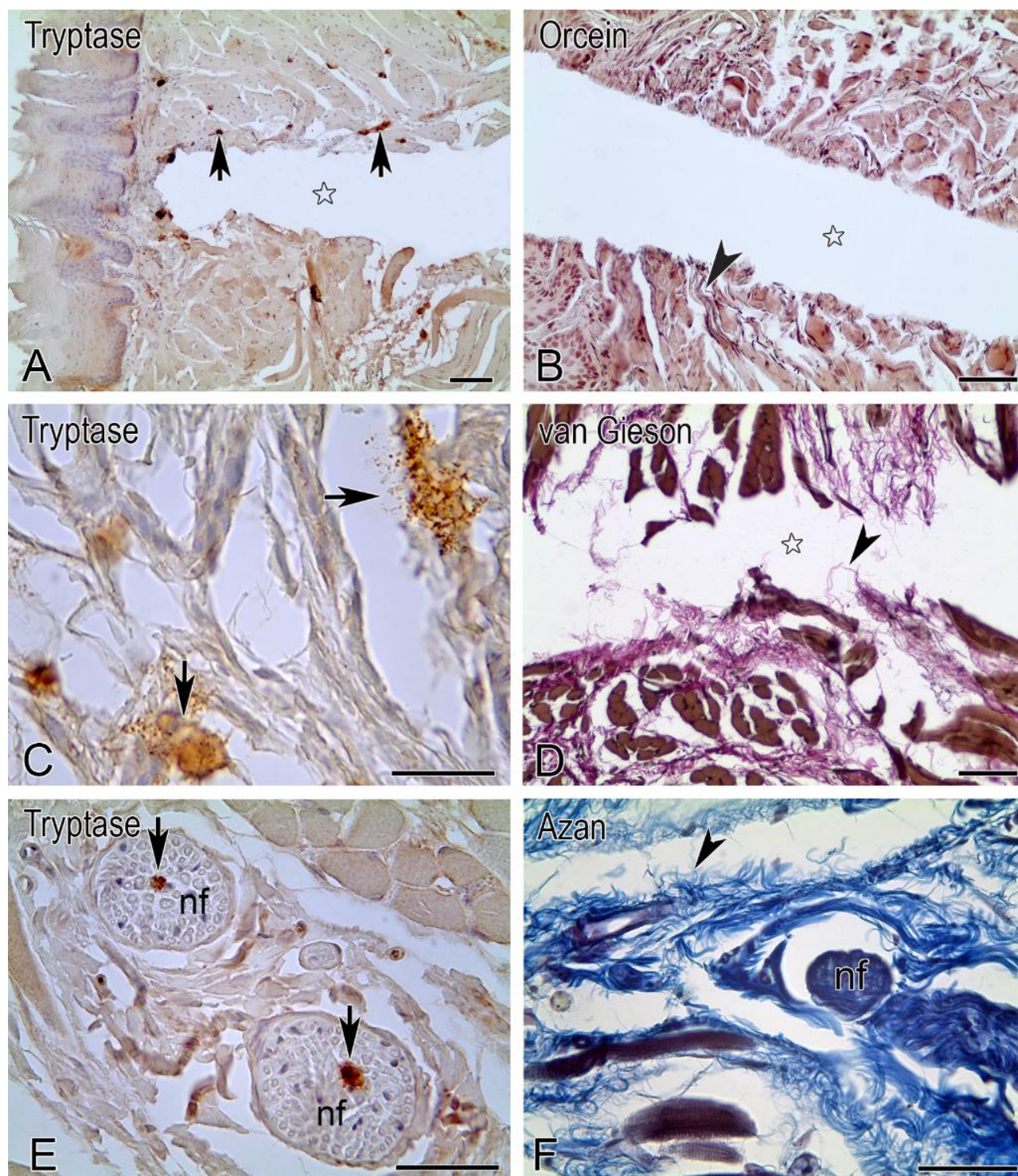


**Фигура 31.** Микрофотография, оцветена с толуидиново синьо, показваща игления тракт, образуван след акупунктура и дегранулиран мастоцит в близост. Мастоцит (МС, стрелка). Мащабна скала = 50 μm

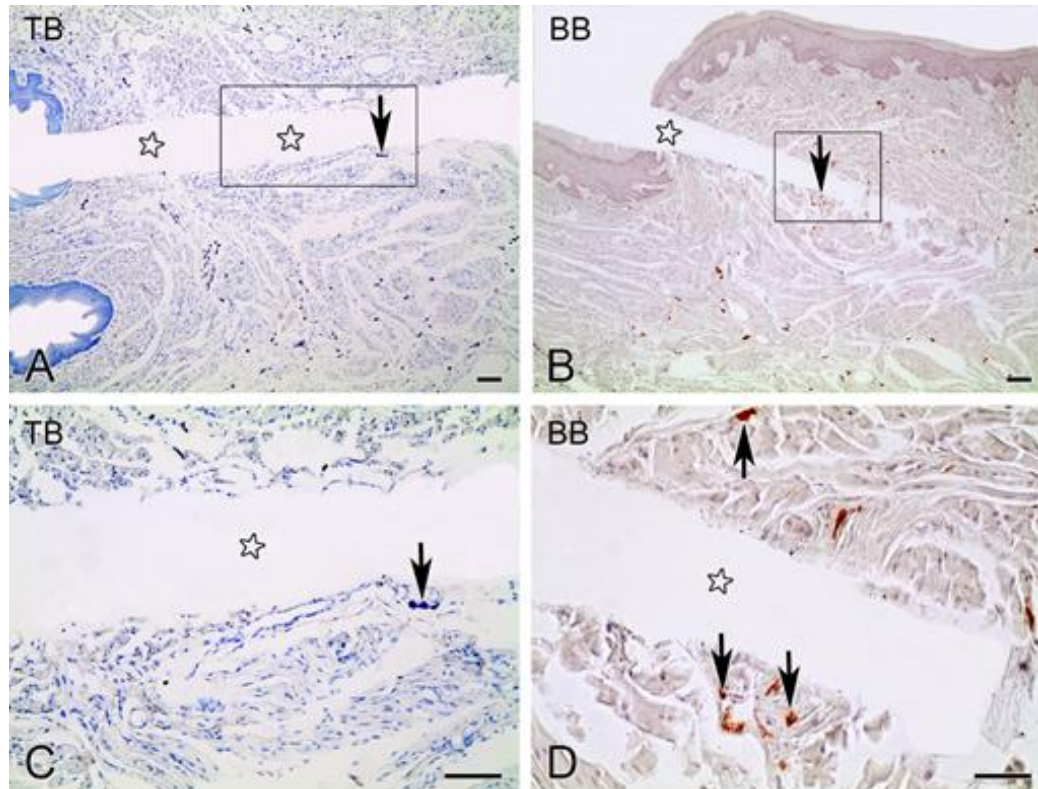
В мускулатурата ясно се визуализира каналът, образуван от акупунктурната игла. Наблюдава се частично разрушаване на мускулни влакна, предизвикано от акупунктурната игла. Сред мускулатурата се виждат кръвоносни съдове, които не са засегнати от убождането (Фиг. 30; 36). Иглата преминава в непосредствена близост до тях, без да ги наранява. Някои от по-малките съдове разположени в близост до канала са деформирани. Кръвоносни съдове, които са частично засегнати от акупунктурната игла, са рядка находка в нашите проби. Откъснати парченца от мускулатурата попадат в акупунктурния канал и могат да бъдат наблюдавани (Фиг. 27; 29).

В съседство с акупунктурния канал в тъканите се наблюдава наличие на мастоцити (МСs). Наблюдава се компресия и частично изместване на тъканта в близост до игления тракт, заедно със съдържащите се в нея МСs. Мастоцитите се визуализират в групи в *lamina propria* и в мускулатурата в езиците при плъхове. В резултат на акупунктурната игла, целостта на тъканите се нарушава. Наблюдава се компресия и изместване на тъканта в близост до игления тракт, заедно с съдържащите се в него МС (Фиг. 35А-Д). В областта на игления тракт някои от МСs показаха признаци на дегранулация с освободени гранули, открити на разстояние от клетката (Фиг. 31; 32С; 33С, D; 34С, D; 35В, D; 36D; 37D).

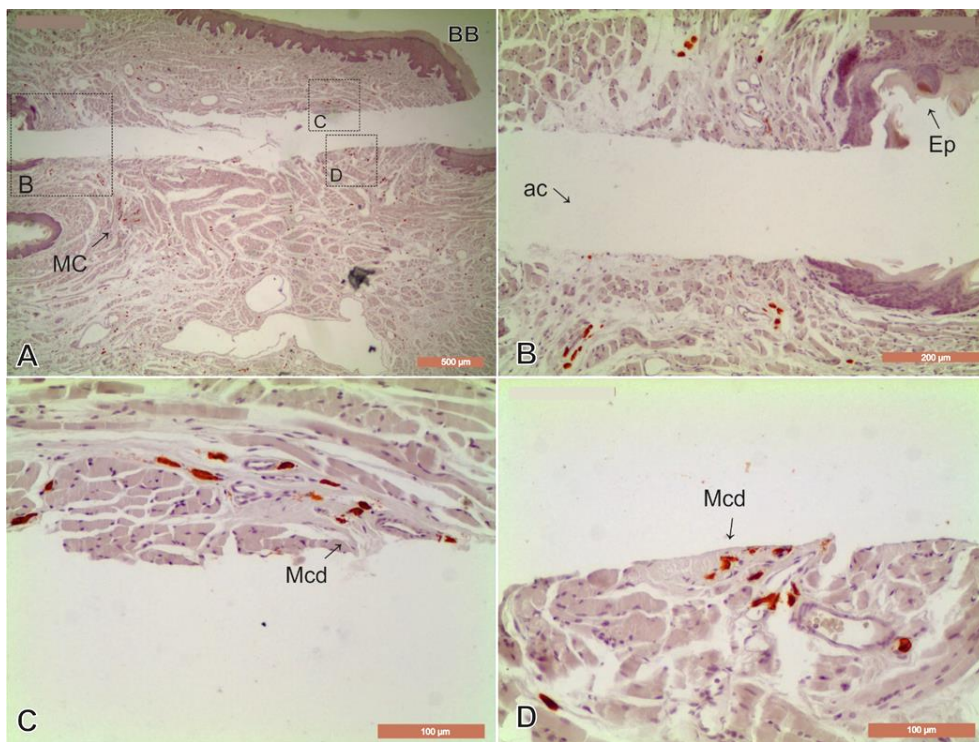
Дегранулирани мастоцити се наблюдават, както в съединителната тъкан на *lamina propria*, така и в съединителната тъкан в мускулатурата, в близост до канала.



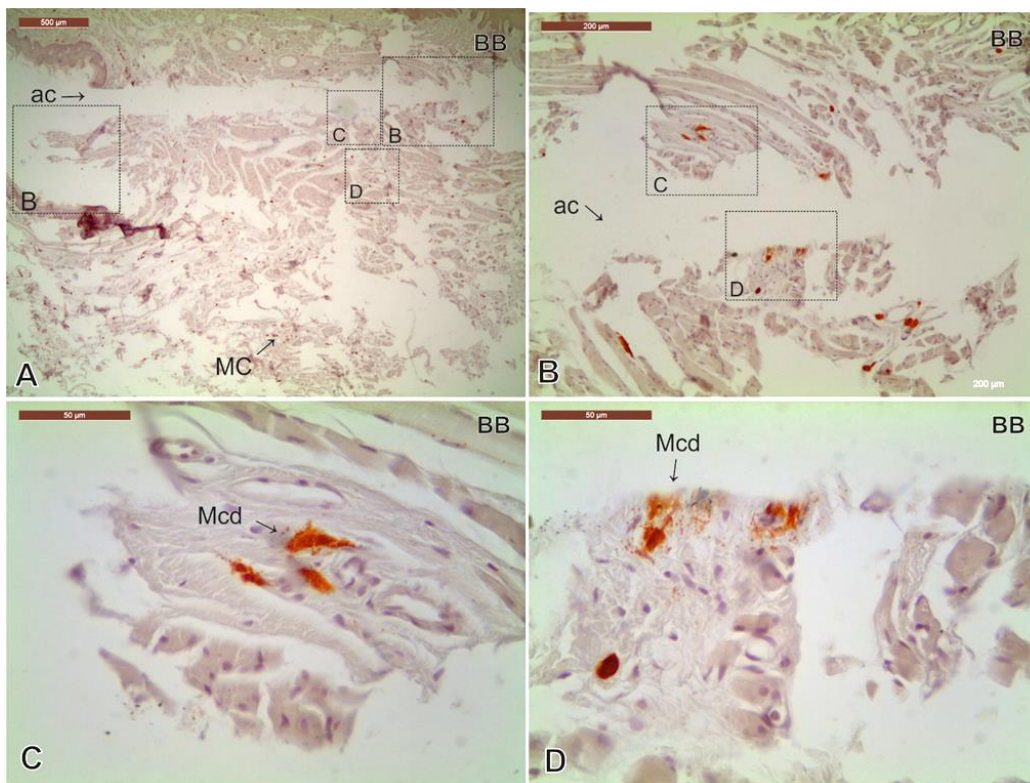
**Фигура 32.** (A, C, E) Триптаза позитивни мастоцити (стрелки) в близост до игления тракт. Микрофотографии, оцветени с Orcein (B), van Gieson (D) и Azan (F), визуализиращи тъканната реакция в близост до игления тракт, образуван след акупунктура. Иглен канал (звезда), (B) еластични влакна (върхове на стрели), (D, F) колагенни влакна (върхове на стрели), нервни влакна (nf). Мащабна скала = 50  $\mu$ m.



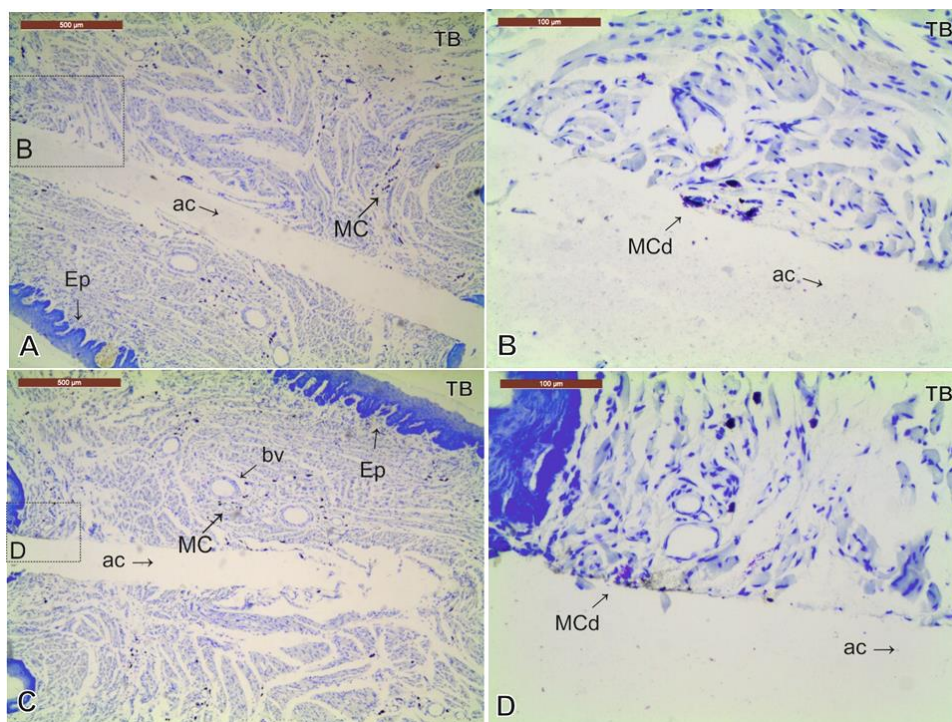
**Фигура 33.** Микрофотографии, оцветени с толуидиново синьо (A, C) и Bismarck Brown (B, D), визуализиращи мастоцити в близост до игления тракт, образуван след акупунктура. Иглен тракт (звезда), мастоцити (стрелки). (C, D). Мастоцити с признаци на дегранулация с освободени гранули, открити на разстояние от клетките. Мащабна скала = 50  $\mu\text{m}$ .



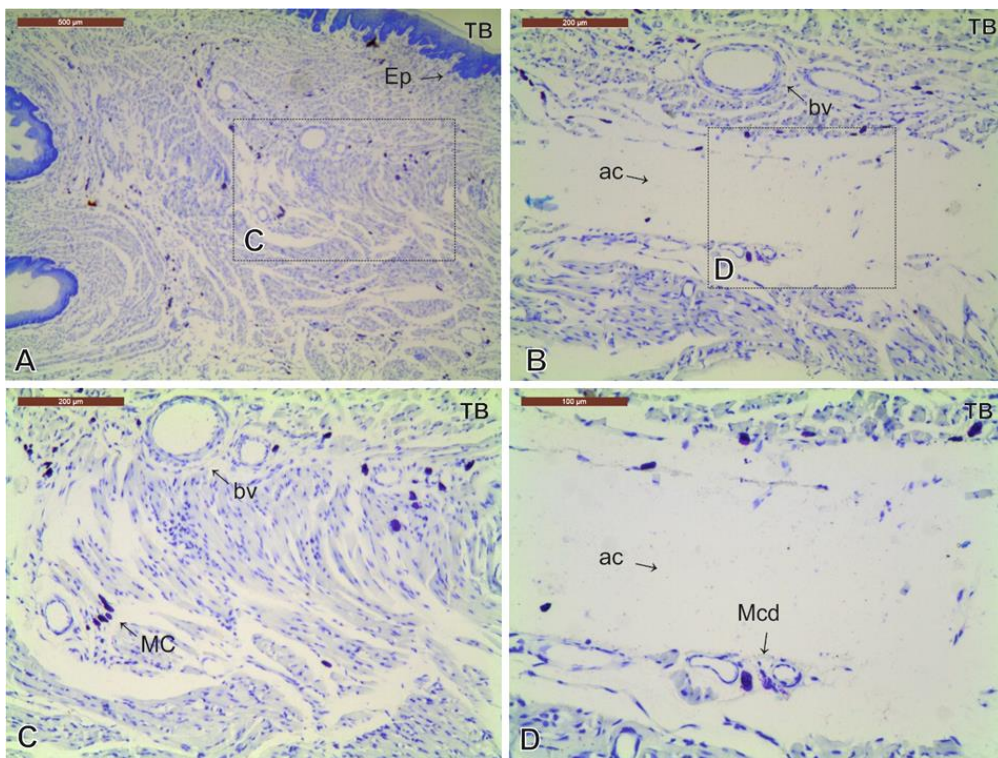
**Фигура 34.** Микрофотографии, оцветени с Bismarck Brown, визуализиращи мастоцити (MC) в близост до акупунктурния канал (ac). Изразена дегранулация на MCs в близост до акупунктурния канал. Епител (Ep), дегранулация на MCs (Mcd). Мащабна скала = 500  $\mu\text{m}$  (A); 200  $\mu\text{m}$  (B); 100  $\mu\text{m}$  (C и D).



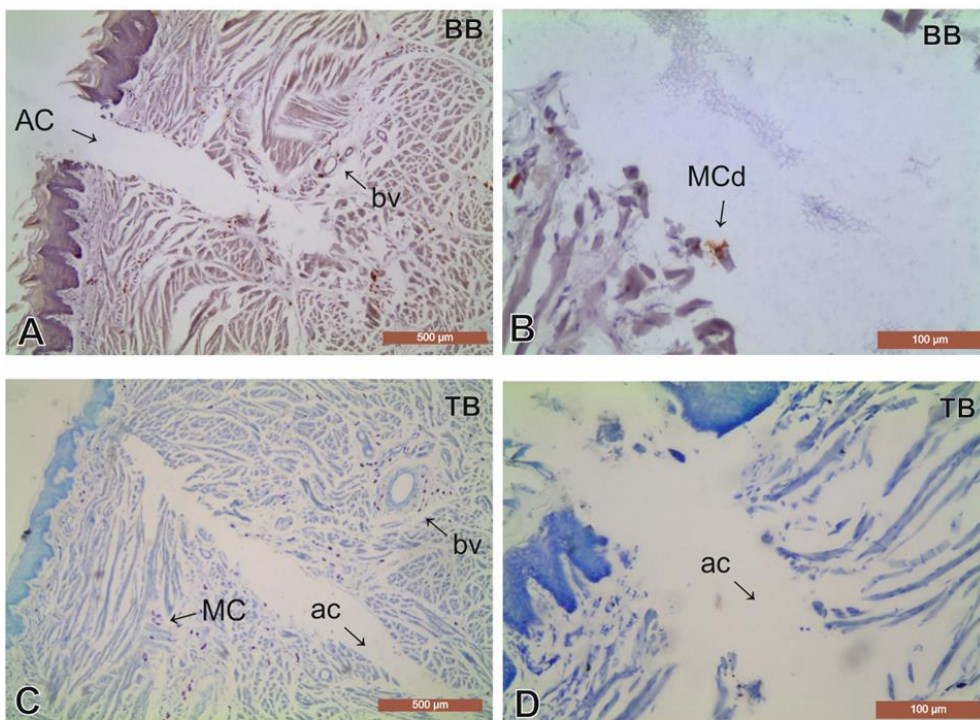
**Фигура 35.** Микрофотографии, оцветени с *Bismarck Brown*. Компресия и изместване на тъканта (мускулатурата) в близост до игления тракт (*ac*) заедно с мастоцитите (*MC*). Изразена дегранулация на *MCs* в близост до игления тракт. Дегранулация на мастоцити (*MCd*). Мащабна лента = 500  $\mu\text{m}$  (A); 200  $\mu\text{m}$  (B); 100  $\mu\text{m}$  (C и D).



**Фигура 36.** Микрофотографии, оцветени с толуидиново синьо, показващи изразена дегранулация (*MCd*) на мастоцити *MC* в близост до акупукуртурния канал (иглен тракт) (*ac*). Епител (*Ep*), *BV* (кръвоносни съдове). Мащабна скала = 500  $\mu\text{m}$  (A), 100  $\mu\text{m}$  (B, D), 500  $\mu\text{m}$  (C)



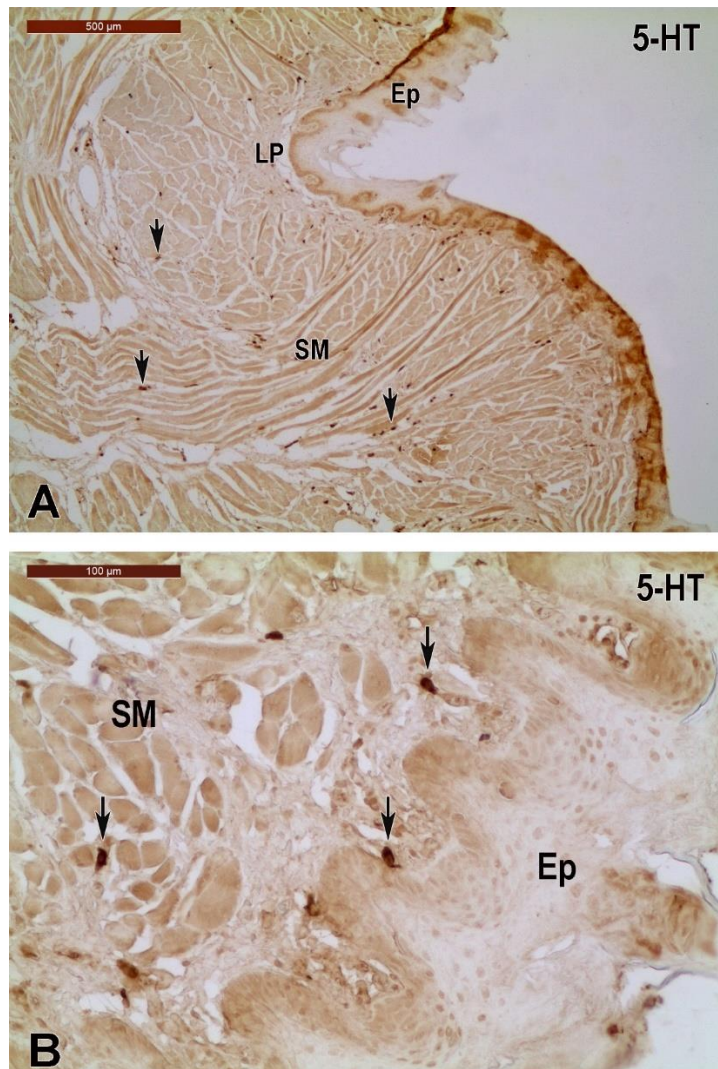
**Фигура 37.** Микрофотографии, оцветени с толуидиново синьо. Акупунктурен канал (ac), мастоцити (MC), дегранулация на мастоцити (Mcd). Епител (Ep), BV (кръвоносни съдове) – не са засегнати от иглата. Мащабна лента = 500  $\mu$ m (A), 200  $\mu$ m (B и C) и 100  $\mu$ m (D).



**Фигура 38.** Микрофотографии, оцветени с Bismarck Brown (A,B) и толуидиново синьо (C, D). (B) Дегранулиран мастоцит на границата с акупунктурния канал (ac). дегранулация на MCs (Mcd), BV (кръвоносни съдове).

Трактът на иглите се визуализира добре при всички оцветявания и реакцията на МСs присъства като масивна дегрануляция на клетките в близост до игления канал. Някои от МСs бяха механично разрушени от акупунктурната игла. Те бяха открити вътре в игления канал задно с отделените от тях гранули (Фиг. 35В, С, D, 38В). Мастоцитите в близост до третираната област, но не в непосредствен контакт с иглата, не бяха дегранулирани (Фиг. 38С).

Наблюдавахме серотонин (Фиг. 39) и триптаза (Фиг. 32А, С, Е) позитивните клетки в близост до акупунктурния канал. Триптазата е специфичен маркер за мастоцити, и може да заключим, че наблюдаваните от нас клетки са МСs. Триптаза позитивните клетки разположени в близост до акупунктурния канал бяха с различна степен на дегрануляция (Фиг. 32А, С). Някои от триптаза позитивните клетки бяха наблюдавани и в нервни влакна в близост до игления тракт (Фиг. 32Е). Разпространението на серотонин позитивните клетки и триптаза позитивните клетки съвпада с това на мастоцитите, визуализирани чрез класическите хистологични техники на оцветяване с толуидиново синьо и *Bismarck Brown*.



**Фигура 39.** (А, В) Микрофотографии, визуализиращи серотонин (5-НТ) позитивни клетки в близост до акупунктурния канал. SM (мускулатура), LP (*lamina propria*), Ep (епител), мастоцити (стрелки). Мащабна лента = 500  $\mu\text{m}$  (А); 100  $\mu\text{m}$  (В).

## V. ДИСКУСИЯ

### 5.1 Нормална морфология в акупунктурна точка Ех-НН-10 на езика

За изпълнение на изследователските цели, които си поставихме ще направим анализ на нормалната морфология на езика при плъх. Трябва да бъде отчетено, че има анатомични разлики в езика на човек и плъх и получените от нашите изследвания резултати не могат директно да се прехвърлят при хората. Научните изследвания върху езикът се затрудняват от липсата на достатъчно данни в тази област. Една от причините за относителната липса на изследвания на човешкия език е неговата сложна анатомия и сложното преплитане на мускулите на езика (*Sandres and Mu, 2013*).

При нашите изследвания установихме, че сагиталните срезове за изследване на езика на плъх осигуряват най-добра визуализация на елементите на епитела, подлежащата съединителна тъкан и мускулатурата в подходяща равнина за проследяване на промените в езика в сравнение с напречните и хоризонтални срезове (*Pirovski et al., 2019a*).

При детайлен анализ на данните от нашите изследвания установихме, че съществува известна разлика и удебеляване на епитела на езика при 3-месечните плъхове в сравнение с 20-дневните плъхове, докато при 12-месечни и 28-месечни животни се наблюдава известно изтъняване на многослойния епител.

Изненадващо, че при най-старите 48-месечни плъхове отново наблюдавахме удебеляване на епитела, което беше статистически значително в сравнение с всички други изследвани групи. Но предполагахме, че е напълно възможно това отклонение да се дължи на малката извадка от 48-месечни опитни животни. *Lamina propria* при 3-месечните плъхове е много добре развита, достигайки максимално развитие при 12-месечни животни. С остаряването, известно изтъняване на *lamina propria* се наблюдава при плъховете, но като цяло има умерена положителна корелация между дебелината на *lamina propria* и възрастта. Плътноста и организацията на еластичните влакната в *lamina propria* са най-високи при 12-месечни плъхове, но с възрастта при по-възрастните плъхове, плътността на еластичните влакна рязко намалява и достига нива, както при 20-дневните животни. При възрастни хора в областта на върха на езика също се наблюдават морфологични изменения на слоевете, структурни промени на миоцити и миофибрили, нерви и неврофибрили (*Takahashi, 2008*).

Според някои изследователи епителът на езика при по-възрастни хора е значително по-тънък в сравнение с по-младите индивиди. Средната дебелина на епитела намалява значително с възрастта (*Sasaki, 1994*). В езика при човек броят, дебелината и дължината на всеки елемент на съединителнотъканното ядро на нишковидните папили намалява приблизително пропорционално с възрастта. Съединителнотъканното ядро на гъбовидните папили също изтънява с възрастта.

(*Kobayashi et al., 2001*). В нашите проучвания няма ясно забележима промяна в папилите и съединителната тъкан в езика. Наблюдавахме относително леко намаляване на обема и височината на съединителната тъкан в папилите при възрастни плъхове. Постепенното намаляване на дебелината на епитела е характерна особеност на бозайниците при стареене. При възрастни мишки се наблюдава увеличение на средната дебелина на епитела, последвано от постепенно намаляване при стареенето. Забележимо увеличение на роговия слой се наблюдава при стареене като адаптивен отговор към намаляване на дебелината на епитела (*Carrard et al., 2008*). За разлика от проучване при възрастни мишки, където се наблюдава увеличение на роговия слой на епитела с възрастта, в нашите проучвания при по-възрастни плъхове не забелязахме подобна тенденция.

Богатата инервация на езика, за която отговарят пет черепно мозъчни нерва (*n.hypoglossus, n.vagus, n.facialis, n.trigeminus* и *n.glossopharyngeus*) предполага и силен рефлекторен ефект върху мозъчната активация. Някои автори развиват концепцията за съществена връзка между биологично активните точки и периферната нервна система (*Zhang et al., 2012*). В нашите изследвания визуализираме наличие на нервни влакна и ганглий в мускулатурата.

Наблюдавахме наличие и струпване на по-голямо количество мастоцити в близост до кръвоносни съдове, в *lamina propria* и мускулатурата, както и струпването им на границите *lamina propria*-мускулатура и в близост до нервни влакна. Струпването на мастоцити в близост до нервни влакна (*Chapman, 1999*), кръвоносни и лимфни съдове е нормална находка и е описано от *Dean* и сътрудници (1997). Лимфните съдове и възли на езика останаха извън възможностите на нашето скромно изследване, но биха били интересен обект за бъдещо проучване.

Изследвания на някои автори предполагат, че няма ясни доказателства за разликата в броя на мастоцитите при млади и по-възрастни животни (*Majeed, 1994*). Много автори наблюдават увеличен брой мастоцити на различни места в тялото в напреднала възраст, поради хроничният възпалителен процес, съпътстващ стареенето (*Mahay et al., 2004*). В наши по-предходни изследвания (*Pirovski et al., 2018*), а също така и в литературата (*Zavala et al., 2013; Hafez, 2019*) са описани данни, че разпределението на мастоцитите в езика на плъхове е различно при плъхове на различна възраст. МСs играят решаваща роля в процеса на стареене на кожата при плъхове. При възрастни плъхове, се наблюдава значително повишаване на кожните нива на хистамин и хепарин в сравнение с контролните животни. В допълнение, има значително увеличение в интактните и дегранулирани дермални МСs в сравнение с контролните животни. Дермалните колагенови снопчета са редуцирани и изкривени на голямо разстояние (*Hafez, 2019*).

Докладвани са възрастови различия в разпределението на мастоцитите в устната кухина, като е доказано, че общият брой МСs в езика, букалната лигавица и гингивалната лигавица е значително по-висок при младите, отколкото при възрастните плъхове. В букалната и гингивалната лигавица при младите животни са открити два пъти повече МСs (*Matsson, 1993*).



Морфологичните изменения в езика при възрастни плъхове не са толкова ясно изразени, както тези описани при възрастни хора. Епителната и мускулна атрофия са по-силно застъпени при възрастни хора, отколкото при възрастни плъхове. Наблюдаваните промени в еластичните влакна и броя на МСs при възрастните плъхове са по-съществени. Тези различия вероятно се дължат на по-краткия живот на плъховете в сравнение с хората или разлика в използваната методология. Това предполага следното уточнение, че въпреки известно съгласие с някои резултати, резултатите получени при възрастни плъхове, не могат да бъдат пряко пренесени към възрастовите промени, които настъпват при хората. Старееето на езика може и да не следва същия модел, както старееето в останалите органи. Възможно е обаче свързаните с възрастта промените в езика да са в резултат от някои заболявания на езика, които се срещат при възрастните.

Нови анатомични структури в изследваната точка в езика на плъх, които не са свързани с някоя от познатите системи в организма не сме открили. Не откриваме наличие на нишковидни микроскопични анатомични структури в кръвоносните и лимфни съдове, които да кореспондират с пътя на традиционните акупунктурни канали и така също не потвърждаваме теорията за съществуването на каналите на *Kim* (1963; 1965). Тази теория все пак се приема от някои изследователи (*Fujiwara and Yu*, 1967; *Soh*, 2009; 2012; *Lee et al.*, 2013; *Kwon et al.*, 2007). Нова теория за спиралната структура на човешкото тяло предлага обособяването на каналната система в тялото като топографско анатомичен обект (*Pirovski and Genov*, 2021).

Резултатите, получени в нашето изследване, показват, че и двете използвани от нас оцветявания (толуидиново синьо и *Bismarck Brown*) са подходящи за визуализиране на МСs. И двете оцветявания обаче имат своите плюсове и минуси. Хистологичното оцветяване *Bismarck Brown* освен мастоцити визуализира и макрофаги, докато боята толуидиново синьо маркира както МСs, така и еозинофили и плазматични клетки.

Количеството на МСs в езика на плъх се променя с възрастта. Общото количество МСs не се променя значително през целия живот, но разпределението им в *lamina propria* и мускулатурата се променя. Младите животни (20 дневни плъхове) имат по-малко мастоцити в *lamina propria*, отколкото в мускулатурата. Това разпределение може да бъде нормална характеристика за растящия организъм. По-възрастните животни (12 месечни плъхове) имат приблизително равно разпределение (*Pirovski et al.*, 2018).

Популацията на МСs е много динамична и може да реагира на различни стимули, като по литературни данни автори съобщават за значително повишаване на плътността на МСs в лигавицата на плъхове при фотодинамична терапия (*Rosin et al.*, 2015).

В резултат на проведените изследвания не открихме силно изразени морфологични различия между нормалната структура на тъканите в областта на акупунктурна точка Ex-HN-10 и съседните тъкани. В проведеното изследване се наблюдаваха нормални анатомични структури, които се променят с възрастта.

Според някои автори при изследване на определени рецептори в и извън точките по тялото не се установява количествена или качествена разлика (*Huang, 1983, Zhang et al., 1982*). Възможно е такова да е положението и в езика, но на този етап от нашите изследвания не може да разграничим количеството на нервните структури в и извън изследваната точка на езика.

Откриваме очевидни различия в разпределението на MCs в точка Ex-HN-10 на езика на плъх и в отделните тъкани в областта на акупунктурната точка. Някои автори споменават за наличие на повишено количество MCs по линиите на каналите при хора и плъхове (*Zhu and Xu, 1990; Zhang et al., 2007; 2008*). На този етап от нашите изследвания не може да потвърдим за такова разпределение и тенденция.

## **5.2 Изменения в морфологията в акупунктурна точка Ex-HN-10 на езика при плъх след акупунктура**

Въвеждането на акупунктурната игла води до разместване на тъканите и разрушаването им, при което се получава тъканен дефект-канал от иглата. Този микроскопичен канал се затваря след изваждането ѝ, като пълното му възстановяване отнема различно време. Метода на изследване, който използваме позволява да се визуализира добре този тъканен дефект – канал от иглата. Акупунктурата е микроинвазивна процедура, което се потвърждава и от нашите наблюдения на минимално разместване и разрушаване на всички тъкани през които преминава иглата, без значение дали е епител, съединителна тъкан или мускулатура. Цялостното възстановяване на канала е бърз процес, както поради еластичните свойства на тъканите, така и в следствие на микроскопичният му размер, което позволява бърза тъканна адхезия. В резултат на това каналът от иглата се затваря след изваждане на иглата и става трудно различим в тъканите. За да се запази видим игленият тракт (акупунктурният канал) образуван от акупунктурната игла трябва да се използва специална методика, при която пробите от език са взети заедно със забитата в изследваната точка игла съгласно методика разработена в катедра „Анатомия“ на Медицински факултет при Тракийски университет - Стара Загора (*Dimitrov, 2012*) за взимане на проби от акупунктурни точки при плъх и човек. В публикации на *Kim* и сътрудници (2006) също се съобщава за използване на методика включваща задържане на иглите в корпорални акупунктурни точки при животни преди лабораторното обработване на биологичния материал.

Методиката за взимане на тъканен материал заедно с иглата е адаптирана за езикът така, че иглата да се фиксира заедно с изследвания материал, а в последствие се изважда непосредствено преди приготвянето на тъканните срезове. По този начин, за първи път от нас успешно се визуализира игленият тракт (акупунктурният канал), както и ефекта му върху съседните на него тъкани в езика. При извършване на акупунктурата на езика не бяха наблюдавани усложнения при плъховете като кървене и болка. Усложнения не са наблюдавани и при прилагане

на акупунктура на езика в изследваната точка при хора (*Wong et al., 2014*), където методът акупунктура на езикът е приложен за лечение без последвали усложнения. Усложнения от акупунктурата се проучват и при здрави доброволци, като там може да се оцени и скала за болката (*Pirovski et al., 2019c*). При наше изследване върху хора при извършване на сравнение между очакванията за болка и изпитаната болка при акупунктура на езика и акупунктурата на крайник установихме, че очакваната болка в повечето случаи е по-силна от регистрираната по време на процедурата. Болезненото усещане при акупунктура на език и крайник е сходно (2.05 език/2.36 крайник). Важно е да се отбележи, че индивидуалните усещания не могат да бъдат пренебрегнати въз основа на статистически данни поради различния праг на болка при различните индивиди (*Pirovski et al., 2019c*).

Трябва да бъде отчетен факта, че има морфологични различия между прилагане на акупунктура на тялото (корпорална акупунктура) и акупунктурата на езика. Основните морфологични разлики при акупунктурата на езика в сравнение с акупунктурата на тялото са: различен епителен слой; висока концентрация на мускулни влакна в езикът, висока концентрация на кръвни, нервни и жлезисти елементи и липса на космени фоликули в езика.

Сагиталните срезове, при изследване на езика, осигуряват най-добрата визуализация на елементите на имунната система, епитела, мускулатурата в подходяща равнина и това е потвърдено и документирано от предходни наши изследвания (*Pirovski et al., 2019*). Сагиталните срезове имат предимство и при изследване на каналът образуван от акупунктурната игла и проследяване на промените след акупунктурата, като трябва да бъде отчетено, че той е малък по размер и могат да се направят ограничен брой срезове от всяка проба. За изследване на нормалната структура на езика при плъхове, други автори също са предпочели изследване на сагитални участъци на езика (*Davydova et al., 2017*).

Поради иновативността на нашето изследване не успяхме да намерим данни за морфологични изследвания на промените на езика в резултат от акупунктура от други автори преди нас. Затова ние сравняваме нашите резултати с описаните промени след акупунктура в акупунктурните точки, разположени по тялото предимно при плъх. Въпреки, че има разлика в анатомичните структури, принципите на въздействие на акупунктурната игла са сходни. Според описаните в литературата промени, предизвикани от акупунктура в акупунктурни точки, разположени по тялото са наблюдавани следните промени: Акупунктурата причинява разрушаване на анатомичните структури в близост до игления тракт, образуван в резултат от акупунктура и деформация в структурите, съседни на игления тракт. Структури като мастни жлези, космени фоликули, кръвоносните съдове са деформирани и сплескани (*Dimitrov, 2012*). В непосредствена близост до игления тракт, образуван след акупунктура, е наблюдавано и описано частично разрушаване и деформация на колагенни и еластичните влакна, нагъване на епитела по посока на игления тракт и увеличаване на колагенни и еластични влакна и клетки заедно с подлежащата под епитела съединителна тъкан. Акупунктурната игла измества тъканите в своя ход и дълбоките кръвоносни съдове и нерви в

близост до игления тракт не са засегнати. Акупунктурната игла, навлизайки в тъканите засяга определени структури в тъканите или преминава близо до тях, без да ги засяга директно (*Dimitrov, 2012*).

Морфологичните промени които регистрираме са в съответствие с резултатите от други автори, които изследват корпорална акупунктура, като могат да се разделят в две категории- разрушаване на структури по хода на иглата и разместване на слоеве, които са съседни на дефекта (*Гойденко и Норкина, 1987; Dimitrov, 2012*). В изготвените от нас препарати на мястото на иглата също се разполага празно пространство, като най-близко разположените до него структури са разрушени и уплътнени. Хлабавата съединителна тъкан е уплътнена, което личи по разместването на клетъчните ѝ елементи, сближаване на колагенни и еластични влакна, които са по-плътно разположени в близост до канала и се наблюдават и в него.

Наблюденията на други автори за деформирани и сплеснати кръвоносни и лимфни съдове (*Гойденко и Норкина, 1987; Kim et al., 2006*) се потвърждават и от нашите резултати. В канала от иглата откриваме частици от мускулни влакна и нерви, колагенни и еластични влакна, което е в съответствие с наблюдавани изменения при корпорална акупунктура (*Dimitrov, 2012*). При нашите изследвания върху език, за разлика от корпоралната акупунктура, няма толкова силно изразено вгъване на епителът и увеличаване на съединителна тъкан и клетки в посока на акупунктурния канал. Това вероятно се дължи на по-малката подвижност на лигавицата на езикът в сравнения с кожата на плъх. При езика липсва добре развита подкожна съединителна тъкан и оформена фасция.

Иглата при поставянето си в езикът и тялото ангажира различен брой слоеве и тъкани, включително и съединителна тъкан. Засягането на колагенните и еластични влакна при корпорална акупунктура е изследвано (*Dimitrov et al., 2015*). Съобщава се за наличие на връзка между съединителната тъкан и акупунктурните канали и точки (*Oschman, 1993; Ho and Knight, 1998*). В тялото съществува връзка между подлежащата съединителна тъкан, с останалите по-дълбоко разположени структури от съединителна тъкан, интра- и интер-мускулно разположената съединителна тъкан (*Langevin and Yandow, 2002*). Предполагаме и наличие на такава връзка в езикът както и със езиковата преграда, която се състои от вертикален слой фиброзна тъкан, простираща се по цялата дължина на средната равнина на езика. Езиковата преграда е тясно свързана с хиоглосусната мембрана, позволявайки свързването на езика с хиоидните мускули. На основата на всичко това можем да кажем, че фасцията се очертава като важна структура за акупунктурните точки и за въздействието върху тях при акупунктура.

Описани са разлики в електрическата проводимост в акупунктурните точки и извън тях по тялото (*Reishmanis et al., 1975; Comunetti et al., 1995*), но при езикът такива изследвания не са правени. Предполага се, че разлики в морфологичният строеж, съединителната тъкан и наличието на съдово-нервни снопове водят до разлики в електрическата проводимост в акупунктурните точки и извън тях. Това може да бъде обект на наши бъдещи изследвания.

В близост до акупунктурните точки на тялото на човек е описано преминаване на съдово-нервни снопове (Heine, 1995; Bauer and Heine, 1998). При нашите изследване в точка *Ex-HN-10* на езика не наблюдавахме преминаване на големи съдове и нерви в близост до акупунктурния канал. Големите кръвоносни съдове и нерви остават в страни и в дълбочина от мястото на иглоубождането.

Наблюдаваното от някои автори струпване на капиляри, лимфни съдове и малки нервни влакна в зоната на акупунктурната точка по тялото (*Yingxia and Zhenguo, 1999*), не се потвърждава за езика на плъх при нашите изследвания. Наблюдаваните от нас кръвоносни съдове и нерви при езика се разполагаха в дълбочина на точката в близост до игления канал, както и локализацията на мастоцитите, но това не е характерно само за акупунктурната точка, а за по-широка област от езика. При хистологични изследвания на акупунктурни точки по тялото при животни се съобщава за наличие на кръвоносни съдове и нерви разположени в дълбочина в прицелните точки (*Kim et al., 2006*), като някои от тях се засягат при акупунктура.

В нашите изследвания, визуализираме в езикът разнообразие от нервни влакна и ганглии от различен произход (различни нерви), които се повлияват от иглоубождането. Това е уникално за акупунктурата на езика, тъй като ангажира едновременно различни нервните елементи и различни пътища в зоната на иглоубождане. Разглеждана е възможната връзка между нервите структури в точки от тялото при корпорална акупунктура и тяхното увреждане за ефекта от акупунктурата (*Dimitrov et al., 2021*). Предполагаме, че е възможна връзка между нервите структури и ефекта от акупунктурата и в точките по езика, защото и при акупунктура на езикът се засягат съдържащите се в зоната нервни структури.

Възможно е лечебния ефект на иглоубождането при езикът, както при корпоралната акупунктура, да зависи от въздействието върху периферната инервация. Въздействието на акупунктурата върху периферната инервация е описано при корпорална акупунктура (*Carlsson et al., 2006; Zhang et al., 2012*). Иглата въздейства върху разположените в близост до акупунктурния канал MCs, като предизвиква тяхната дегрануация, което е визуализирано при нашите изследвания. Други автори също са наблюдавали дегранулиране на MCs в резултат на акупунктурна стимулация при корпорална акупунктура (*Dimitrov et al., 2017; Zhang et al., 2008*), като някои отчитат и ролята на колагенните влакна за дегрануацията (*Yu et al., 2009*). MCs в съединителната тъкан играят роля в трансформиране на механичния сигнал в химичен след акупунктурна стимулация (*Wang et al., 2009*).

Получените резултати от това изследване за ролята на MCs, потвърждават предишните наши проучвания. Наблюдаваното натрупване на MCs около нервните снопове и кръвоносните съдове съвпада с описаното нормално разпределение на MCs за съответната възраст (*Pirovski et al., 2018*).

Ролята на MCs в обезболяващия ефект (аналгезия) при акупунктура и повишената дегрануация на MCs след акупунктура е описана от автори (*Zhang et al., 2007; Dimitrov et al., 2017*). Предишните ни изследвания потвърждават тезата

за влиянието на акупунктурата върху МСs на езика (*Pirovski et al., 2019a,b*). Но има и автори, които твърдят, че броят и дегрануацията на МСs не се влияе от акупунктурата (*Zong et al., 1992*). Описан е ефект на локално дразнене и освобождаване на неuropeптиди от сетивните нерви в резултат на акупунктура. (*Lundeberg, 1999*).

Дегрануация на МСs е наблюдавана не само след акупунктура, но и след лазерпунктура (*Cheng et al., 2009*) и моксиотерапия (*He and Luo, 2007; He and Chen, 2010*), като степента на дегрануация на МСs при моксиотерапия е по-голяма (*Luo et al., 2007*). Дегрануация на мастоцитите е наблюдавана и след електропунктура (*Li et al., 2003; Гурьянова и сътр., 2006*). Забележими промени в броя на мастоцитите в точките и масивната им дегрануация са най-изразени 1 h след акупунктура (*Гурьянова и сътр., 2007*). Възможно е поради тази причина в нашите изследвания количеството наблюдавани МСs да не се променя в зоната на акупунктурния канал, тъй като опитната постановка при нас включва 10 мин престояване на акупунктурната игла в езика на упоеното животно. Ние наблюдаваме дегрануирани МСs в областта на акупунктурния канал като е възможно тази дегрануация да е предизвикана от поставянето на акупунктурната игла, което се потвърждава от някои автори (*Гурьянова и сътр., 2007; Zhang et al., 2008; Yu et al., 2009*). Деформацията на колагенните и еластичните влакна от акупунктурната игла също може да предизвика дегрануация на разположените в съседство на акупунктурния канал мастоцитите (*Yu et al., 2008*).

В кожата на плъх серотонин имунореактивни са почти всички мастоцитите (*Feng and Wu, 1989*). Наблюдавахме освобождаване на серотонин от клетки разположени в близост до акупунктурния канал като с това потвърждаваме наличието на серотонин позитивни клетки (МСs) в зоната на акупунктурно въздействие (*Dimitrov et al., 2017a*). Разпространението на серотонин позитивните клетки в голяма степен съвпада с това на мастоцитите, визуализирани при нашите изследвания с *Toluidine blue* и *Bismarck Brown*. Установено е, че освен серотонин се освобождава и хистамин от МСs в резултат на електропунктура в точка ST<sub>36</sub> (*Ming et al., 2000*) и при акупунктура (*Dimitrov et al., 2016b*).

Повишеното количество МСs и тяхното дегрануиране се дължи вероятно на механично въздействие и на включване на каскада от реакции, която довежда до дегрануация на близко разположените МСs. Връзка между дегрануацията на МСs и някои от акупунктурните ефекти е предложена от много изследователи (*Zhang, et al., 2007, 2008; Dimitrov et al., 2016; 2017a,b*).

Популацията на МСs е много динамична и може да реагира на различни стимули— след фотодинамична терапия се съобщава за значително увеличение на плътността на МСs в лигавиците на плъхове (*Rosin et al., 2015*). Мастоцитите и микроциркулацията са описани като основни структури ангажирани при лезии на езика (*Rosin et al., 2015*). Еозинофилите също са доказани като активни участници във възстановяването на езика след прорезни рани, като достигат максимален брой на 3-тия ден и се възвръщат до нормален брой на 6-тия ден. Тези клетки като потенциален източник на трансформираният растежният фактор TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$

показват ролята на еозинофилите и МСs и влиянието им върху епителните клетки за пролиферацията, ангиогенезата и организацията на раната (*Zeinoun et al., 2009*). Тесните анатомични асоциации предполагат комуникация между нервните влакна и имунните клетки, което може да бъде от решаващо значение за поддържане на хомеостазата на лигавицата и за осигуряване на подходящ отговор при нараняване (*Kispélyi et al., 2014*). Това може да бъде част от морфологичния субстрат на рефлексогенния отговор след манипулации върху езика, каквато е акупунктурата. Перспективно в бъдеще е и комбинирането на акупунктура със сублинвално приложение на различни лекарства и биологично активни вещества. За това е необходимо в бъдеще сравнително изследване на лигавицата на устната кухина при различни животни, за да се идентифицира най-добрият животински модел(и) за неклинична оценка на продукти за сублингвална имунотерапия. Лигавицата на устната кухина на мини прасета и маймуни е най-близка до тази на хората, а имунните мрежи са доста сходни между всички гризачи и негризачи. Тези данни също подкрепят използването на плъхове и минипрасета за извършване на проучвания за биоразпределение и безопасност на сублингвални продукти (*Thirion-Delalande et al., 2017*). Също така не трябва да се пренебрегва близкият контакт на мастоцитите с клонове на тригеминалния нерв. Доказано е, че стимулирането на тригеминалния нерв води до активиране на МСs и съдовата пропускливост в устната кухина, което предполага, че вещества инхибитори на МСs могат да се използват за лечение на възпалителни заболявания в устната кухина (*Alhelal et al., 2014*).

Интересна тема е и изработването на електронен заместител на езика. Това е в съгласие с модерната хибридна концепция (*Winqvist et al., 2000*). Тя е допълнително разширена и също така включва други видове йон-селективни електроди, като се използват измервания на импеданс при различни честоти и дори изследвания на абсорбцията на светлина. В по-широк аспект, други електронни сетива също могат да бъдат комбинирани за подобряване на производителността на системата и изработването на персонализирани електронни езици за специфични приложения. Такъв пример е комбинацията от електронен език и електронен нос, използвани за класификацията на различни плодови сокове (*Winqvist et al., 2000*).

Морфологичният анализ на възрастовите изменения в езика при плъх и на промените настъпващи в резултат на акупунктура би спомогнал за по-добро разбиране на механизмите и анатомичните структури отговарящи за ефекта на акупунктурната терапия при животните и човека.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционните медицински практики и в частност акупунктурата имат своето място в медицинската практика и са съвместими със съвременната наука. Акупунктурата на езика като вид манипулация представлява интерес за нашето проучване с морфологичните ѝ аспекти. Езикът е свързан със съществени функции в живия организъм и от тази гледна точка той винаги е представлявал интересен обект за изучаване както от морфологията, така и от клиниката. Изследването на възрастовите изменения добавя допълнително измерение на разбирането по темата, като сме използвали 20 дневни, 3 месечни, 12 месечни, 28 месечни и 48 месечни плъхове. При изследване на нормалната морфология на езикът ние установихме, че дебелината на епитела и на собствената пластинка, както и броят на мастоцитите на  $1 \text{ mm}^2$  положително корелират с напредване на възрастта, докато гъстотата на еластичните влакна намалява. Експерименталната акупунктура предизвиква морфологични промени в езикът на плъх изразяващи се в нарушаване на целостта на епитела, изменения в подлежащата съединителна тъкан и мускулатура, без засягане на големи кръвоносни съдове и нерви. Акупунктурата на езикът предизвиква дегранулиране на мастоцити в близост до игленият тракт, образуван при поставянето на акупунктурната игла. Това потвърждава валидността на теорията за ефекта от иглоубождането поради взаимодействие между имунната и нервната система. Докторската дисертация е допълнена с клинично проучване на акупунктурата на езика при здрави доброволци.

## VII. ИЗВОДИ

1. Установените морфологични различия в дебелината на епитела при 20 дневни, 3 месечни, 12 месечни, 28 месечни и 48 месечни плъхове силно статистически значимо положително корелират с напредване на възрастта.
2. Различията в дебелината на *lamina propria* са възрастово обусловени и с напредване на възрастта се наблюдава умерена положителна корелация между дебелината на *lamina propria* и възрастта.
3. Плътноста на еластичните влакна намалява с възрастта, но не се наблюдава статистически значима отрицателна корелация между тези два фактора.
4. Броят на мастоцитите с напредване на възрастта се увеличава и умерено положително корелира с възрастта.
5. Експерименталната акупунктура предизвиква морфологични изменения в езика на плъх изразяващи се в нарушаване целостта на епитела, изменения



в подлежащата съединителна тъкан и мускулатура. Не се наблюдава засягане на големи кръвоносни съдове и нерви.

6. Акупунктурата на езика предизвиква дегранулиране на мастоцити в близост до игленият тракт, образуван при поставянето на акупунктурната игла.

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

### **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ**

1. Създаване на оригинална опитната постановка и методика за визуализиране на игленият тракт в езика на плъх.
2. Успешно визуализиране на игления тракт в езика на плъх.
3. Изследване на възрастовите изменения настъпващи в дебелината на епитела, дебелината на *lamina propria*, гъстотата на еластичните влакна и броят на мастоцитите в езика на плъх.
4. Оригинални данни относно морфологията на език при много възрастни плъхове на 48 месеца.

### **ПОТВЪРДИТЕЛНИ ПРИНОСИ**

1. Потвърдени са възрастовите изменения в морфологичните структури на езика при плъх.
2. Потвърдена е дегрануляция на мастоцитите в тъканите настъпваща в резултат на акупунктура.

## IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Pirovski, N.**, Dimitrov, N., Atanasova, D. (2019) Methodical approach to assessment of the morphological changes in acupuncture of tongue. *Trakia Journal of Sciences* 17(2): 73-75.
2. **Pirovski, N.**, Staykova-Pirovska, Y., Hamza, S., Iliev, S., Atanasova, D., Dimitrov, N. (2019) Acupuncture on the tongue on healthy volunteers – questionnaire. *Science & Technologies* 9(1): 17-24.
3. **Pirovski, N.**, Staykova-Pirovska, Y., Atanasova, D., Dimitrov, N. (2019) Mast cell reaction to acupuncture on tongue. *Trakia Journal of Sciences* (17)3: 199-202.
4. **Pirovski, N.**, Tomov, N., Atanasova, D., Dimitrov, N. (2018) Mast Cells in the Rat Tongue. *Acta Morphologica et Anthropologica* 25(3-4): 84-89.
5. **Pirovski N.**, Atanasova, D., Keskinova, D., Dimitrov N. (2022) Age –related changes in rat tongue. *Comptes Rendus de l'Académie bulgare des Sciences – accepted* (IF<sub>2020</sub> = **0.378, Q2**)

## X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Y. Staykova-Pirovska, **Pirovski, N.**, Dimitrov, N., Atanasova, D. Sivrev D, Tomov.N, Iliev S. (2016). Tongue examination – its value for the general practitioner. *ICMART XVIII World Congress on Medical Acupuncture, in Sofia, 10-12 June, Bulgaria. ICMART XVIII World Congress on Medical Acupuncture, Abstract, p 103.*
2. **N. Pirovski**, N. Tomov, D. Atanasova, N. Dimitrov (2018). Mast cells in the rat tongue. *VIIth National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10, Sofia, Bulgaria.*
3. **Пировски Н.**, Стамболова Х.. (2018). Акупунктура на език на плъх. *Юбилейна научна конференция „Съвременни тенденции в здравните грижи “Пет години Филиал Сливен на МУ-Варна 21-22 септември, Варненски медицински форум, т. 7, 2018, прил. 4, стр. 289-293.*
4. **N. Pirovski**, Y. Staykova-Pirovska, S. Hamza, S. Iliev, D. Atanasova, N. Dimitrov (2019): Acupuncture on the tongue on healthy volunteers – questionnaire. *XXIX Международна научна конференция организирана съвместно от Съюз на учените*

- Стара Загора, „Мини Марица-Изток”и Тракийски университет – Стара Загора, 6-7 Юни, Стара Загора, България. Abstract, p.9.

5. **N. Pirovski**, N. Dimitrov, D. Atanasova (2019): Methodical approach to assessment of the morphological changes in acupuncture of tongue. *XXIV Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation, May 31 - June 02, Stara Zagora Mineral Bath, Bulgaria. Abstract, p.53.*

## XI. SUMMARY

Traditional medical practices, and acupuncture in particular, have their place in medical practice and are compatible with modern science. Acupuncture of the tongue with its morphological aspects and as a type of manipulation is of interest for our study. Tongue is associated with essential functions in a living organism and from this point of view it has always been an interesting object for study by both morphology and the clinic. The study of age changes (using 20-day-old, 3-month-old, 12-month-old, 28-month-old and 48-month-old rats), added an additional dimension of understanding of the topic. When examining the normal morphology of the tongue, we found that the thickness of the *epithelium* and *lamina propria*, as well as the number of mast cells per 1 mm<sup>2</sup> positively correlated with age, while the density of elastic fibers decreased. Experimental acupuncture causes morphological changes in the tongue of the rat, manifested in disruption of the integrity of the epithelium, changes in the underlying connective tissue, muscles, and small nerves, without affecting large blood vessels and nerves. Acupuncture of the tongue caused degranulation of mast cells near the needle tract formed during the placement of the acupuncture needle. This confirms the validity of the theory of the effect of acupuncture due to the interaction between the immune and nervous systems. This PhD thesis is complemented by a clinical study of tongue acupuncture in healthy volunteers.