

МОРФОЛОШКА И МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА АКУМУЛАЦИЈЕ ЛИПОФУСЦИНСКОГ ПИГМЕНТА У ГАНГЛИЈСКИМ ЋЕЛИЈАМА ЦЕРВИКАЛНОГ ДЕЛА СИМПАТИЧКОГ СТАБЛА У ТОКУ ПРОЦЕСА СТАРЕЊА

Филиповић Т.¹, Стефановић Н.², Витошевић З.¹, Миљисављевић М.³, Ђукић Н.¹, Мандић П.¹, Матејић С.⁴, Шарановић М.¹

¹Институт за анатомију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за анатомију, Медицински факултет Ниш

³Институт за анатомију, Медицински факултет Београд

⁴Институт за судску медицину, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC ANALYSIS OF ACCUMULATION OF LIPOFUSCIN PIGMENT IN GANGLIA CELLS IN THE CERVICAL PART OF SYMPATHETIC TRUNK IN THE PROCESS OF OLD AGE

Филиповић Т.¹, Стефановић Н.², Витошевић З.¹, Миљисављевић М.³, Ђукић Н.¹, Мандић П.¹, Матејић С.⁴, Шарановић М.¹

¹Institute of anatomy, Medical faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

²Institute of anatomy, Medical faculty Nis

³Institute of anatomy, Medical faculty Beograd

⁴Institute of Phorensic medicine, Medical faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Old age can be defined as a variety of changes in structure and function which begin at the stage of reproductive maturity, and that changes are manifested as a lesser ability of adaptation and lesser way of defending from the influence of outside and inside factors. Neurons of sympathetic trunk, as well as the other neuron cells, are changeable during the life. Neurobiological, old age begins at the time of birth, because the number of neurons is not increasing, it's only getting lower, which means that neurons are post mitotic cells. The process of old age is increased with some degenerative changes at some diseases and its hard to know what belongs to, so called, physiologic way of getting old and what is pathologic. Concentration of lipofuscin in cells (pigment of old age), is the parameter for physiologic old age of a person. Concentration is changeable, and it depends from the tissue or the organ, concentration is controlled by the internal regulatory factors and the factors of environment as the way of nutrition, physical activity, stress and hygienic factors.

Key words: Cervical ganglions, Lipofuscin, Old age.

САЖЕТАК

Старење се може дефинисати као низ промена у структури и функцији које почињу након постигнуте репродуктивне зрелости, а манифестује се смањеном способношћу прилагођавања и савладавања спољашњих и унутрашњих утицаја. Неурони симпатичког стабла као и друге нервне ћелије подлежу променама у току живота. Неуробиолошки, старење започиње рођењем, јер се број неурона не увећава, већ само смањује, односно нервне ћелије су постмитотичке. Процеси старења испреплићу се са низом дегенеративних промена код појединих обољења и тешко је издиференцирати шта је патолошко, а шта припада, такозваном, физиолошком процесу старења. Концентрација ћелијског липофусцина или пигмента старења, дефинитивно је сразмерна физиолошком старењу индивидуе. Концентрација варира у зависности од ткива или органа; контролисана је унутрашњим регулаторним факторима, али и условима средине као што су исхрана, физичка активност, стрес и хигијенски услови.

Кључне речи: Цервикални ганглиони, Липофусцин, Старење.

УВОД

Синхроно са старењем читавог организма старе и одумиру и нервне ћелије, а познато је да човеков нервни систем омогућава опажање најсуптилнијих про-

мена, како из околине, тако и из самог организма. На примљене надражаје организам реагује на адекватан начин тако да се успоставља равнотежа у унутрашњо-

сти, а и са спољашњом средином. Старењем се нарушава та уравнотеженост и долази до појаве обољења. Као један од фактора који се дефинитивно везује за старење и старост, је пигмент назван липофусцин. Интересантна су питања какво је место овог пигмента у односу на здраво и болесно; кад би се могла спречити његова акумулација, да ли би то имало позитивног ефекта на јединку, да ли утиче на настанак сенилности, појединих болести, па чак и смрти. Извесно је да на појачану акумулацију пигмента утичу хормонски дисбаланси, имуно реакције, хронична обољења, ауто-оксидантна средства као и неки лекови.

ЦИЉ РАДА

У циљу доприноса бољем разјашњењу проблема акумулације липофусцина урадили смо следеће:

1. Применом хистолошких и хистохемијских метода анализирали смо промене у вратном делу симпатичког стабла.
2. Извршили смо утврђивање присуства пигмента и сагледали животно доба када се он појављује, као и даљу динамику његове акумулације у ганглијским ћелијама.
3. Одредили смо морфолошке облике његове акумулације у вратном делу симпатичког стабла у односу на животно доба.
4. Применом морфометријских метода, извршена је квантификација (нумеричка густина) ганглијских ћелија без пигмента, са делимично присутним пигментом и оних које су потпуно испуњене пигментом.
5. Квантификација броја ганглијских ћелија омогућава да се одреди процентуални губитак истих у току старења.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Као материјал коришћени су хумани ганглиони, узети методом макродисекције са обдукционог материјала. У току узимања материјала водило се рачуна да узрок смрти особе није обољење које погађа нервни систем. Узорци су узимани методом макродисекције из вратног дела (горњи вратни ганглион) у различитим животној добима (од 20 до изнад 70 година живота).

Ткивни узорци су разврстани у три старосне групе: од 20-39 година, од 40-69 година и изнад 70 година. Фиксација узорака је извршена 10% неутралним формалином.

Хистолошке методе

После фиксације, материјал је укалушљен на уобичајен начин, затим резан у пресеке дебљине 5 микрона. Пресеци су бојени ХЕ-методом, Metilen-blü, Флорантин трихромним бојењем, сребрном импрегнацијом по Masson-fontani (ткива су постфиксирани у Вупеновој течности).

Карактеристичне промене сликане су дигиталном камером на различитим повећањима.

Морфометријске методе

За морфометријску анализу коришћен је тестни систем M_{42} и пројекциони микроскоп са екраном Rei-

chart Wisoran. Баждарење микроскопа урађено је објективним микрометром за повећање 63X и одређена је површина тестног система, A_c која је за десет поља, на којима је рађено, износила $0,23mm^2$.

Анализа је урађена на повећању окулара 63X, а анализирано је 60 видних поља по једном случају. Број потребних видних поља одређен је према пробном узорку, а применом формуле:

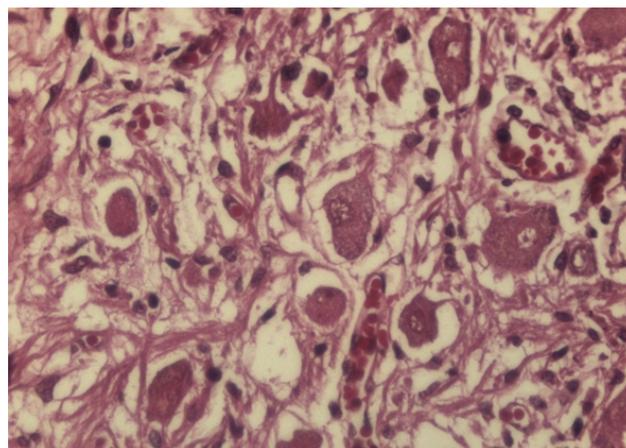
$$N = (20 * SD / X)^2$$

За одређивање нумеричке густине ганглијских ћелија коришћена је метода за дебеле резове по Floderusu, а према формули:

$$N_v = N_A / (t + D - 2h)$$

РЕЗУЛТАТИ РАДА

У првој старосној групи, од двадесет до тридесет девет година старости, у вратном делу, ганглијске ћелије се уочавају као овалне или полигоналне формације, неправилно разбацане, јасно ограничене. (Слика 1) Липофусцински пигмент, ако постоји, је обично дифузно дистрибуиран, а сасвим ретко груписан у једном делу ћелијске цитоплазме у виду пигментних гранула.



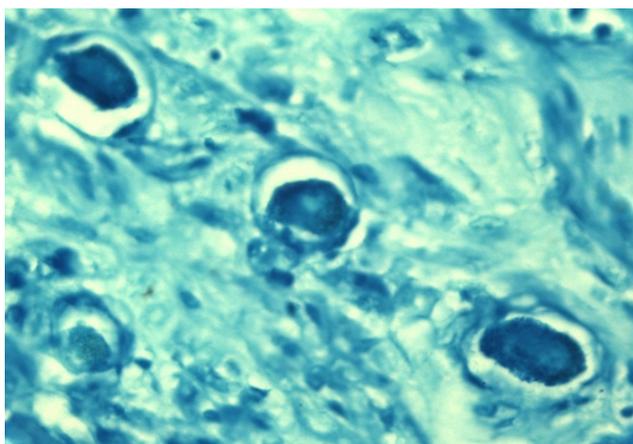
Слика 1. - HE, (10X), вратни део симпатичког стабла, I старосна група.

Ганглијске ћелије садрже овално, најчешће централно постављено једро, са мало хроматинске супстанце, и једним јасно уочљивим тамно хиперхромним једарцетом, које је постављено ексцентрично.

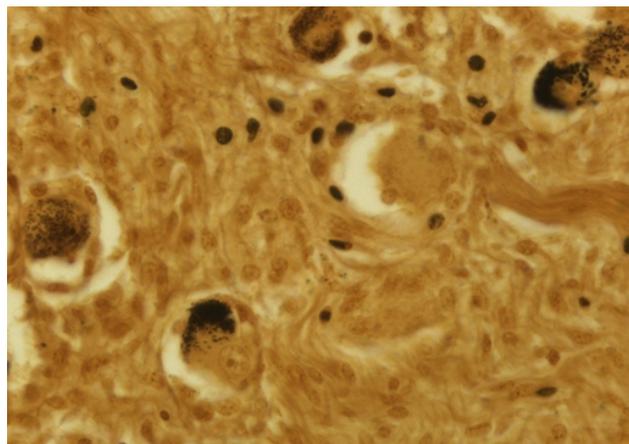
Око ганглијских ћелија налазе се ретикулинска, аргирофилна влакна, у која су уткане глијалне ћелије амфицити.

У другој старосној групи, старости од четрдесет до шездесет девет година, у ћелијама ганглиона вратног дела симпатичког стабла нисмо запазили значајније промене ћелијских једара. Међутим, у овој старосној групи, акумулација липофусцинског пигмента је била интензивна и са различитом дистрибуцијом пигментних гранула.

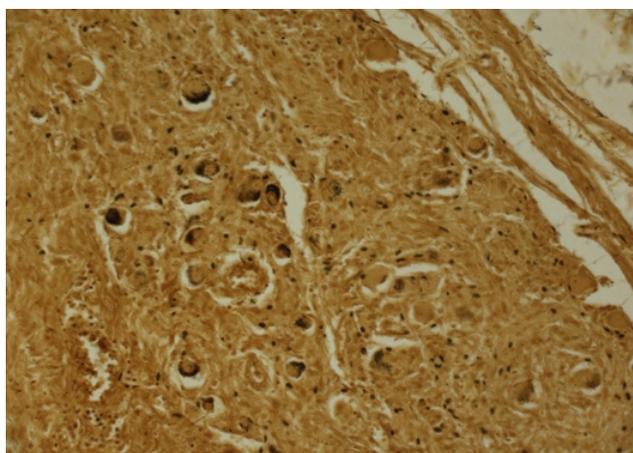
У овој групи, поред ћелија које су садржавале пигмент, уочене су и ћелије без пигментних гранула, додуше у нешто мањем броју. (Слика 2)



Слика 2. - Metilen-blu, (40X), вратни део симпатичког стабла, II старосна група.



Слика 4. - Mason-fontana, Ag impregnacija, (40X), вратни део симпатичког стабла, III старосна група.



Слика 3. - Mason-fontana, Ag-impregnacija, (10X), вратни део симпатичког стабла, III старосна група.

У трећој старосној групи, изнад седамдесет година, мења се облик и величина ганглијских ћелија вратног дела симпатичког стабла. Оне постају неправилне, смањују се у обиму, скврчавају и испуњавају липофусцинским пигментом. Једро је мање, нејасне опне или је она наборана, тамније је пребојено, пикнотично и најчешће померено према периферији, а липофусцински пигмент је различито дистрибуиран. (Слика 3 и 4)

Табела 1. - Релативни удео ћелија са одређеним садржајем пигмента у цервикалном делу симпатичког стабла, у односу на животну доб

Животна доб	Без пигмента (%)	Са делим. присутним пигм. (%)	Потпуно испуњене пигм. (%)	Укупно
20-39	81.5	18.5	0.0	100%
40-69	29.3	56.6	14.1	100%
≥70	10.4	64.5	25.1	100%

Уочили смо да су у првој старосној групи, у вратном делу, процентуално најзаступљеније ћелије без пигмента (81,5%), у другој ћелије са делимичним присуством пигмента (56,6%), и у трећој групи доминирају ћелије са делимичним присуством пигмента (64,5%) али се запажа и повећање процентуалне заступљености ћелија потпуно испуњених пигментом (25,1%) у односу на прве две групе.

Табела 2. показује да у цервикалном делу симпатичког стабла постоји сигнификантан пад просечне нумеричке густине ћелија без пигмента у животној доби од 40-69 година (1484mm^2) и у животној доби преко 70 година (627mm^2) у односу на најмлађу старосну групу ($2801,8\text{mm}^2$). Истовремено постоји сигнификантан пораст просечне нумеричке густине ћелија са делимич-

Табела 2. - Расподела квантификованих ганглијских ћелија у цервикалном делу симпатичког стабла, у односу на животну доб и садржај пигмента.

Животна доб	Без пигмента				Са делимич. присутним пигментом				Потпуно испуњене пигментом			
	Х бар	±СЕ	СД	Вар%	Х бар	±СЕ	СД	Вар%	Х бар	±СЕ	СД	Вар%
20-39	2801.8	449.3	361.9	12.9	637.6	217.9	175.5	27.5	-	-	-	-
сигн.	сигн.		нс		сигн.		нс		сигн.		-	-
40-69	1484.0	790.7	636.9	42.9	2865.6	800.0	644.4	22.4	711.2	758.4	519.9	73.1
сигн.	сигн.		нс		сигн.		нс		сигн.		нс	
≥70	627.0	163.0	131.3	20.9	3902.8	678.5	546.5	14.0	1516.8	266.4	214.6	14.1

нумеричка густина (mm^2)

но присутним пигментом у старосној групи од 40-69 година ($2865,6\text{mm}^2$) у односу на годишта 20-39 година ($637,6\text{mm}^2$), односно преко 70 година ($3902,8\text{mm}^2$) у односу на старосну групу од 40-69 година. Ћелије које су потпуно испуњене пигментом присутне су само у годинама старости преко 40 и то тако да их има у просеку значајно више у годинама старости преко 70 ($1516,8\text{mm}^2$) у односу на старосну доб 40-69 година ($711,2\text{mm}^2$).

ДИСКУСИЈА

Липофусцин је мрко-жућкаст, аутофлуоресцентни пигмент који се прогресивно акумулира с временом у лизозомима постмитотичких ћелија, као што су неурони и миоцити срца (1). Тачан механизам ове акумулације је још увек нејасан. Многе студије указују да формирање липофусцина зависи од оксидативних процеса. Липофусцин се, наиме, не елиминира потпуно (било разградњом или егзоцитозом) чак и код младих, па се тако с временом акумулира у постмитотичким ћелијама. Пошто су оксидативни процеси неопходни за живот, они ће деловати као фактор независан од година, на акумулацију липофусцина (6). Акумулација липофусцина у постмитотичким ћелијама је препознатљива ознака старења, а обрнуто пропорционална дужини живота (3).

У току истраживања установили смо да у ганглионима симпатичког стабла постоји, генерално гледано, тренд пада заступљености ћелија без пигмента, а пораста оних делимично испуњених пигментом. Тако је у вратном делу заступљеност ћелија без пигмента износила 81,5% у првој старосној групи, у другој 29,3%, а свега 10,4% у трећој старосној групи. Синхроно, број ћелија са делимично присутним пигментом се повећавао са 18,5% у првој групи, преко 56,6% у другој, до чак 64,5% у трећој. У најмлађој старосној групи ћелија које су потпуно испуњене пигментом није било, да би, након 40-те године старости њима припадало 14,1% укупног удела ћелија у ганглиону, а након 70-те чак 25,1%. Овај наш налаз се поклапа са резултатима Yates-а и Mann-а (2), који су открили да губитак нервних ћелија у просеку, а у различитим деловима нервног система, износи од 15-30%. Сматрамо да би тај проценат ганглијских ћелија у овом делу симпатичког стабла могао бити и функционално изгубљен.

Још није јасно колико пигмент утиче на функцију нервних ћелија али је сигурно да са старењем постоји линеарни пораст броја ћелија са пигментом, као и повећање количине пигмента у цитоплазми, те је појава пигмента сигурно обележје старих ћелија.

Sulkin (5) сматра да излагање хроничној хипоксији појачава акумулацију пигмента у нервним ћелијама.

У култури ћелија оксидативни стрес потпомагао је акумулацију липофусцина, док је примена антиоксиданата смањивао. Међутим, истраживања Oenzila, Kishikawe, Mizuna i Nakana (4) указују да у поређењу с другим ткивима, на пример срчаним мишићем, мозак има бољи заштитни систем у оксидативном стресу.

ЗАКЉУЧАК

1. Хистолошком анализом ганглиона, вратног дела симпатичког стабла закључујемо да са старењем настају: атрофија, односно смањење величине ганглијских ћелија, скврчавање и пропадање истих, смањење запремине, промена облика и померање једра и акумулација липофусцинског пигмента у цитоплазми.

2. Анализа акумулације липофусцинског пигмента показује да се она повећава са старењем. Запажени су следећи облици акумулације: дифузни тип, униполарни, биполарни или "bisgast" тип, непотпун или потпун прстен око једра и онај када пигмент испуњава ћелије у потпуности.

3. Нумеричка густина ганглијских ћелија без пигмента се прогресивно смањује почевши од најмлађе старосне групе ка старијим.

4. Нагли пораст густине ћелија с пигментом је у другој старосној групи (40-69 година).

5. У најмлађој старосној групи, од 20-39 година нису примећене ћелије потпуно испуњене липофусцинским пигментом. Њихова појава забележена је у другој старосној групи. Највећа заступљеност ових ћелија забележена је у овом делу стабла у старосној групи изнад 70 година (25,1%).

ЛИТАРАТУРА

1. Bjorkerud S.: Studies of lipofuscin granules of human cardiac muscle. II Chemical analysis of isolated granules. *Mol Pathol.* 1964, Exp 3: 337-389.
2. Mann D.M., Yates P.O, Stamp J.E.: The relationship between lipofuscin and ageing in the human nervous system; *J Neurol Sci* 1978. Jun; 37(1-2):83-93.
3. Mann D.N.A. and Yates P.O.: Lipoprotein pigments-their relationship to aging in the human nervous system. The lipofuscin content of nerve cells. 1974, *Brain*, 97:481-488.
4. Oenzil F., Kishikawa M., Mizuno T., Nakano M.: Age-related accumulation of lipofuscin in three different regions of rat brain; *Mech Ageing Dev.* 1994. Oct 20; 76(2-3):157-63.
5. Sulkin N. M. and Kuntz A.: Histochemical alteration in autonomic ganglion cells associated with aging, *J. Gerontol* 1952, 7: 533-549.
6. Terman a, Brunk UT : Lipofuscin : mechanisms of formation and increase with age; Department of Pathology II, Faculty of Health Sciences, Linkoping University, Sweden. *APMIS.* 1998 Feb; 106 (2): 265-76.