

## АНАЛИЗА ПРОМЕНА И АКУМУЛАЦИЈА ЛИПОФУСЦИНСКОГ ПИГМЕНТА У ЋЕЛИЈАМА ГАНГЛИОНА ТОРАКАЛНОГ ДЕЛА СИМПАТИЧКОГ СТАБЛА У ТОКУ ПРОЦЕСА СТАРЕЊА

Филиповић Т.<sup>1</sup>, Витошевић З.<sup>1</sup>, Мандић П.<sup>1</sup>, Ђукић Н.<sup>1</sup>, Милисављевић М.<sup>2</sup>, Стефановић Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

<sup>2</sup>Медицински факултет Београд

<sup>3</sup>Медицински факултет Ниш

## ANALYSIS OF CHANGES AND ACCUMULATION OF LIPOFUSCIN PIGMENT IN CELLS OF THORACIC GANGLIA OF SYMPATHETIC TRUNK DURING AGING

Филиповић Т.<sup>1</sup>, Витошевић З.<sup>1</sup>, Мандић П.<sup>1</sup>, Ђукић Н.<sup>1</sup>, Милисављевић М.<sup>2</sup>, Стефановић Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>2</sup>Medical faculty Niš

<sup>3</sup>Medical faculty Belgrade

### SUMMARY

In the region of the thorax there are ten till twelve ganglia (ganglia thoracica); which are white; triangle and irregular shape; rarely fusiform (spindle-shaped) or round. In the upper part of the thorax; ganglia are located in front of the neck of ribs (collum costae); and in the middle part they are in front of head of ribs (caput costae). In the lower parts; they are near the vertebral bodies; therefore both of the trunks are slightly convergent. In this part; there are no branches which connected both sides of the sympathetic trunk. Lipofuscin is yellow-brown; autofluorescent pigment; accumulated during aging in the lysosome of postmitotic cells; such as neurons.

**Keywords:** lipofuscin pigment; aging; sympathetic trunk

### САЖЕТАК

У пределу грудног коша налази се десет до дванаест ганглиона (ganglia thoracica), који су беличасте боје, троугластог или неправилног облика, а ређе вретенасти или округли. Ганглиони се у горњем делу грудног коша налазе испред врата ребра (collum costae), у средњем делу они су постављени испред главе ребра (caput costae). У доњем делу налазе на бочну страну тела кичмених пршљенова, стога су оба симпатичка стабла у погледу правца лако конвергентна (8). У овом пределу не постоје гране које повезују ганглионе супротних страна. Липофусцин је мркожућкаст, аутофлуоресцентни пигмент који се прогресивно акумулира с временом у лизозомима постмитотичких ћелија, као што су неурони.

**Кључне речи:** липофусцин; старење; симпатичко стабло

### УВОД

Неурони торакалног дела 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 (2). 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. Хановер је 1842. године први описао пигмент жућкастомрке боје у нервној ћелији, а Бораст 1922. године уводи термин липофусцин. Да се овај пигмент налази и у другим ћелијама, али да је његова акумулација у нервним у вези са старењем први је указао Хампери 1934. године.

### ЦИЉ РАДА

Циљ овог истраживања био је да се применом хистолошких и хистохемијских метода изврши анализа морфолошких промена у торакалном делу симпатичког стабла, у току процеса старења. Сходно томе утврдили смо присуство пигмента и сагледали животно доба када се он појављује у већој мери, као и даљу динамику његове акумулације у ганглијским ћелијама. Одредили смо морфолошке облике његове акумулације у деловима симпатичког стабла, а у односу на животну доб.

Применом морфометријских метода, извршили смо квантификацију (нумеричка густина) ганглијских ћелија без пигмента, са делимично присутним пигментом и оних које су потпуно испуњене пигментом и на основу тога одредили процентуални губитак истих у току старења.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Као материјал коришћени су хумани ганглиони, узети методом макродисекције. У току узимања материјала водило се рачуна да узрок смрти особе није обољење које погађа нервни систем. Узорци су узимани у различитим животним 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.

За морфометријску анализу коришћен је тестни систем М42 и пројекциони микроскоп са екраном Reichart Wisoran. Баждарење микроскопа урађено је објективним микрометром за повећање 63X и одређена је површина тестног система, Ат која је за десет поља на којима је рађено износила 0,23мм<sup>2</sup>.

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

$$N = (20 \cdot CD/X)^2$$

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

$$N_B = N_A / (t + D - 2x)$$

У датој формули  $N_A$  представља број ганглијских ћелија на површини тестног система, "t" је дебљина реза, "D" просечан пречник ћелије, а "x" корекциони фактор.

Нумеричка густина одређивана је за ћелије без пигмента ( $N_{Ab}$ ), за ћелије које су делимично садржавале пигмент ( $N_{Ab}$ ) и за ћелије које су у потпуности испуњене пигментом (назире се или се неочава једро -  $N_{Ab}$ ).

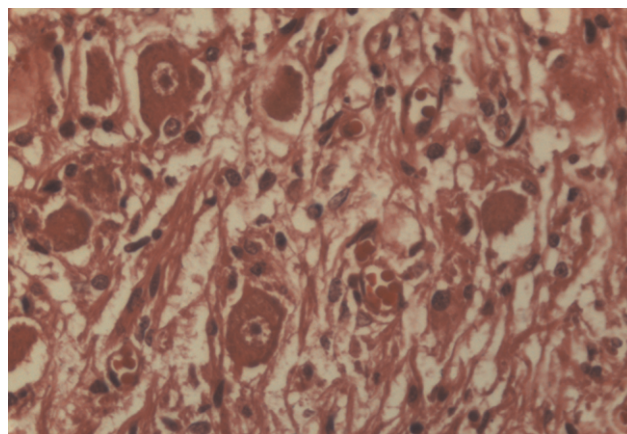
## РЕЗУЛТАТИ

У првој старосној групи, од двадесет до тридесет девет година старости, у торакалном делу симпатичког стабла, ганглијске ћелије се уочавају као овалне или полигоналне формације, неправилно разбацане, јасно ограничене (Сл.1). Трихромним бојењем ћелије се јасно издвајају као тамније, округле или овалне формације (Сл.2.), без липофусцинског пигмента Липофусцински пигмент, ако постоји, је обично дифузно дистрибуиран, а сасвим ретко груписан у једном делу ћелијске цитоплазме у виду пигментних гранула.

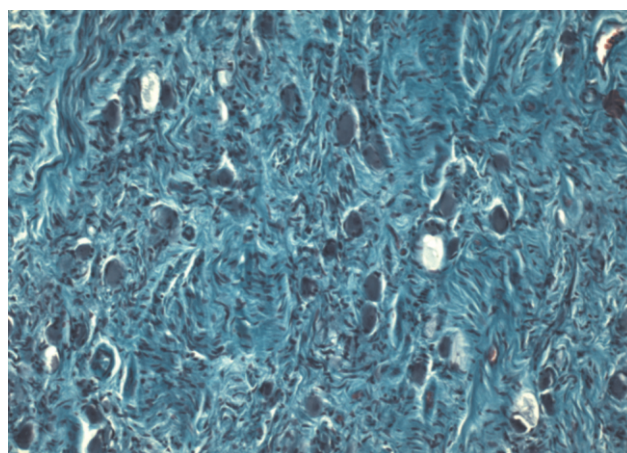
Ганглијске ћелије садрже овално, најчешће централно постављено једро, са мало хроматинске супстанце, и једним јасно уочљивим тамно хиперхромним једарцетом, које је постављено ексцентрично.

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

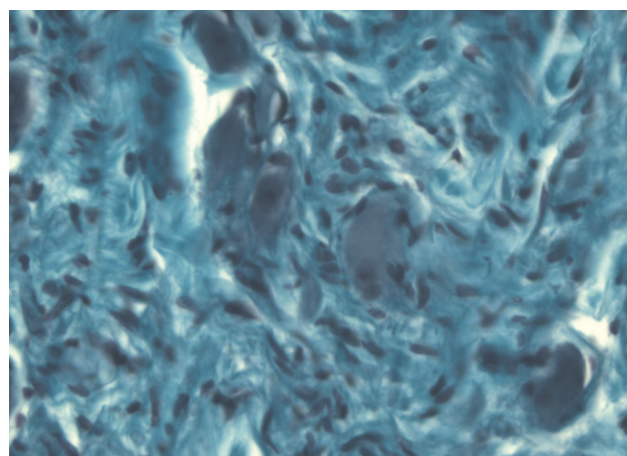
У другој старосној групи, старости од четрдесет до шездесет девет година, у ћелијама ганглиона торакалног дела симпатичког стабла нисмо запазили значајније промене ћелијских једара. Међутим, у овој старосној групи, акумулација липофусцинског пигмента је



Слика 1. HE, (40X), грудни део симпатичког стабла, I група



Слика 2. Трихромно бојење - Florantin, (10X), I група



Слика 3. Трихромно бојење - Florantin, (40X), I група

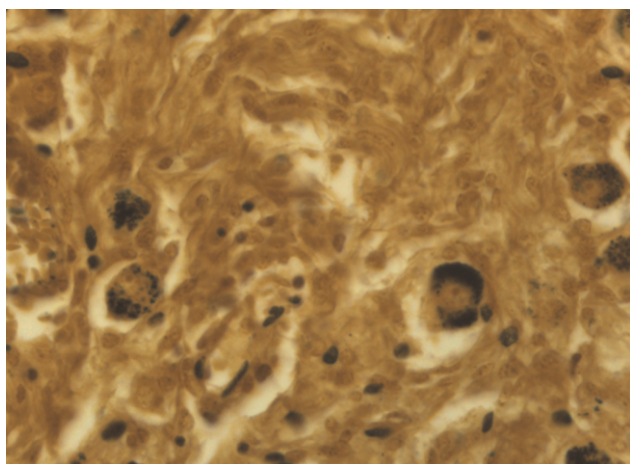
била интензивна и са различитом дистрибуцијом пигментних гранула. У другој старосној групи, у ганглијским ћелијама торакалног дела симпатичког стабла могу се још увек уочити ћелије без пигмента али се број оних у којима се пигмент налази, знатно повећава.



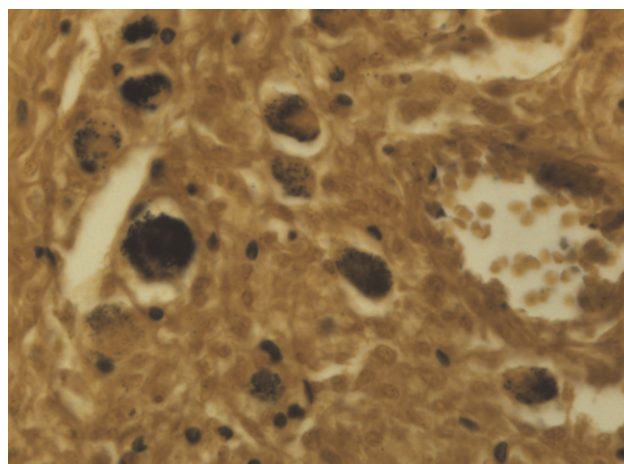
**Табела 1.** Расподела квантификованих ганглијских ћелија у торакалном делу симпатичког стабла, у односу на старосну доб и садржај пигмента.

Торакални део симпатичког стабла - нумеричка густина (mm<sup>2</sup>)

Добне групе	Без пигмента				Са делимично присутним пигментом				Потпуно испуњење пигментом			
	Xbar	±SE	SD	Var%	Xbar	±SE	SD	Var%	Xbar	±SE	SD	Var%
20-39г	84,2 p<0.05	46,3	20,6 p>0.05	9,8	780,2 p<0.05	218,9	176,3 p>0.05	2,5	- p<0.05	-	- p<0.05	-
40-69г	28,2 p<0.05	46,5	40,2 p>0.05	0,7	718,8 p>0.05	95,4	85,1 p<0.05	34,5	142,5 p<0.05	70,8	57,0 p>0.05	40,0
≥70	893,4	351,3	283,1	31,6	5123,4	432,9	348,7	6,8	1422,2	607,3	489,2	34,4



Слика 4. Mason-Fontana, Ag-импрегнација, (40X) II група



Слика 5. Mason-Fontana, Ag-импрегнација, (40X), III група

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

У трећој старосној групи, изнад седамдесет година, мења се облик и величина ганглијских ћелија торакалног дела симпатичког стабла. (Сл.3.) Оне постају неправилне, смањују се у обиму, скврчавају и испуњавају липофусциним пигментом. Једро је мање, нејасне опне или је она наборана, тамније је пребојено, пикнотично и најчешће умерено према периферији. У групи изнад седамдесет година, доминирају ћелије делимично или потпуно испуњене пигментом и јасно се уочавају различити облици његове акумулације (Сл.4 и Сл.5)

## ДИСКУСИЈА

Са старењем, долази до појачане акумулације липофусцина, што се поклапа са налазима Термана и Брунка (4), који су и установили да је овај пигмент неразградив и да се не може уклонити егзоцитозом.

У првој старосној групи, запазили смо да липофусцини пигмент, ако постоји, је обично дифузно дистрибуиран, а сасвим ретко груписан у једном делу ћелијске

цитоплазме у виду пигментних гранула. У другој старосној групи, могле су се још увек уочити ћелије без пигмента али се знатно повећавао број оних у којима се пигмент уочавао. Акумулација липофусциног пигмента је била интензивна и са различитом дистрибуцијом пигментних гранула.

У трећој старосној групи, изнад седамдесет година, мења се облик и величина ганглијских ћелија симпатичког стабла. Оне постају неправилне, смањују се у обиму, скврчавају и испуњавају липофусциним пигментом. Хистолошко запажање о дистрибуцији пигментних гранула у цитоплазми ганглијских ћелија у складу је са налазима Броду-а (1), који сличан распоред описује у неуронима мозга и оливарног једра.

Учили смо да долази до смањења величине нервног тела, једро је било дугуластије и умерено ка једном крају ћелије, скврчено и пикнотично, а површина ћелије набрана. Ове промене се сматрају класичним променама нервних ћелија у процесу старења које за крајњи исход имају лизу цитоплазме и једра при чему у лежиштима ћелија остају некротични грануларни и дезинтегрисани ћелијски остаци, а које је у својим истраживањима описао и J.Pick (3).

У торакалном делу симпатичког стабла, заступљеност ћелија без пигмента, у првој старосној групи износила је 87,1%, у другој је забележен пад на 35,5%, а у трећој старосној групи их је било само 12%. Постојао је тренд пораста ћелија са делимичним присуством липофусцинског пигмента. Њихова заступљеност се кретала од 12,9% у првој старосној групи, преко 62% у групи преко четрдесет година живота, до 68,9% у трећој старосној групи, тј. преко седамдесет година живота. У овом делу симпатичког стабла у најмлађој старосној групи нисмо запазили присуство ћелија потпуно испуњених пигментом. Забележили смо њихову појаву у другој старосној групи, преко четрдесет година старости, а њихова заступљеност је износила 2,5%. У трећој старосној групи, изнад седамдесет година, њихов удео је износио 19,1%.

Интересантно је, међутим, да и у старијој животној доби, изнад 70 година, постоје ћелије које не садрже пигмент. Постоје мишљења да су овакве ћелије метаболички слабије активне, па самим тим поштеђене акумулације пигментних гранула, јер се сматра да је липофусцин отпадни производ метаболизма.

## ЗАКЉУЧЦИ

Хистолошком анализом ганглијских ћелија, торакалног 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.

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

Нумеричка густина ганглијских ћелија без пигмента се прогресивно смањује почевши од најмлађе старосне групе ка старијим у свим деловима симпатичког стабла. Интересантно је да се и у најстаријој групи, преко 70 година, уочава у одређеном проценту (до 12% у торакалном делу) присуство ћелија без гранула липофусцинског пигмента.

Нумеричка густина ганглијских ћелија са пигментом повећава се статистички значајно у посматраном делу симпатичког стабла, уз смањење учешћа ћелија без пигмента у току процеса старења. Нагли пораст густине ћелија с пигментом је у другој старосној групи (40-69 година).

Густина ћелија са делимичним присуством пигмента се значајно повећавала се са старењем. Статистичка значајност постоји у старосној доби од 40- 69 година.

У најмлађој старосној групи, од 20-39 година нису примећене ћелије потпуно испуњене липофусцинским пигментом. Њихова појава зебележена је тек у другој старосној групи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Brody H. and Vijayashankar N.: Anatomical change in the nervous system. Handbook of the Biology of Aging. 1977, ed. By C.E. Finch and S. Hayflick, Van Nostram - Reinhold New York. St 246-261
2. Brunk U. and Ericsson J.L.E.: Electron microscopical studies on the brain neurons. Localisations of acid phosphatase and mode of formations lipofiscin bodies. 1972, J Ultrastr Res 38: 1-15
3. Pick Joseph: Pigment, abnormal Mitochondrial and Laminar Bodies in Human Sympathetic Neurons. 1967, Z. Zellforsch 82: 118-135
4. Terman A., Brunk U.T. : 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