

*Originalni članci/
Original articles*

GLIOZA PINEALNE ŽLEZDE KOD ČOVEKA
TOKOM STARENJA
GLIOSIS OF PINEAL GLAND IN HUMANS
DURING AGING

Milan Popović¹, Valerija Munteanu², Dejan Miljković¹,
Aleksandra Rakovac³, Dušan Vapa⁴, Dušan Lalošević^{1, 5},
Ivan Čapo¹

Correspondence to:

Dr Milan Popović

Univerzitet u Novom Sadu - Medicinski
fakultet, Katedra za histologiju i embri-
ologiju,
Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
e-mail: milan.popovic@mf.uns.ac.rs

¹ Univerzitet u Novom Sadu/ Medicinski Fakultet, Katedra za
histologiju i embriologiju,

² Klinički centar Vojvodine, Novi Sad / Klinika za radiologiju,

³ Univerzitet u Novom Sadu / Medicinski fakultet, Katedra za fiziologiju,

⁴ Univerzitet u Novom Sadu / Medicinski fakultet, Katedra za sudsku
medicinu

⁵ Pasterov Zavod, Novi Sad

Ključne reči

pinealna žlezda, glijalne ćelije, starenje,
S-100β

Key words

pineal gland, glial cells, aging, S-100β

Sažetak

Uvod: Pinealna žlezda predstavlja neuroendokrini organ. U građi parenhima žlezde učestvuju u većem procentu pinealociti i oko 5% glijalne ćelije. Ranija istraživanja su pokazala da se tokom starenja pored povećanog nagomilavanja pigmenta u pinealocitima, smanjenja celularnosti žlezde, pojave kalcifikata uočava se i pojava glioze.

Cilj: Cilj ove studije je bio praćenje ekspresija markera S-100β u tkivu humane pinealne žlezde, kao i utvrđivanje razlika u ekspresiji markera S-100β u zavisnosti od pola i u zavisnosti od starosne dobi.

Materijal i metode: Istraživanje je obuhvatilo 26 uzorka humanih pinealnih žlezda koji su podeljeni u dve grupe: I grupa (n=13) – pinealne žlezde ljudi sa manje od 50 godina, i II grupa (n=13) – pinealne žlezde ljudi sa više od 50 godina. Nakon histološke obrade uzorka preseki su bojeni metodom hematoksilin-eozin kao i imunohistohemijskom metodom na S-100β protein. Određen je broj glijalnih ćelija pinealne žlezde, ukupan broj ćelija i površina na kojoj su se te ćelije nalazile. Poređenje dobijenih podataka vršeno je uz pomoć Mann-Whitney testa, a vrednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

Rezultati: Kod ljudi mlađih od 50 godina, uočen je povećan ukupni broj ćelija po jedinici površine. Procenat glijalnih ćelija je povećan kod grupe II, odnosno kod grupe sa pinealnim žlezdama ljudi starijih od 50 godina.

Zaključak: Glijalne ćelije humane pinealne žlezde čoveka pokazuju imunopozitivnost na imunohistohemijski marker S-100β. Procenat glijalnih ćelija se povećava kod čoveka tokom starenja, a kod mlađih ljudi pinealni parenhim je celularniji.

UVOD

Pinealna žlezda (*glandula pinealis s. epiphysis cerebri*) predstavlja neuroendokrini organ oblika konusa i smeštena je na zadnjem zidu III moždane komore. Vodi poreklo od neuroektoderma i predstavlja deo epitalamusa (1,2). Stroma se sastoji od vezivnih septi koje dele žlezdu na lobulose, dok u građi parenhima učestvuju u većem procentu pinealociti i oko 5% glijalne ćelije (3,4). Pojedini autori danas opisuju još i perivaskularne fagocite, peptidgerične *neuron-like* ćelije i neurone (5). Pinealociti su ćelije zadužene za sekreciju hor-

mona melatonina, koji kod ljudi reguliše ciklus budnost-spa-
vanje, a sintetiše se tokom noći (6). Glijalne ćelije, pojedini
autori još i nazivaju intersticijalnim ćelijama (7, 8), pinealoc-
itima tipa II (9), ili pak astrocitima (10). Japanski autori u svo-
joj studiji opisuju ove intersticijalne ćelije kao ćelije koje se
nalaze između pinealocita sa čijeg tela kreću citoplazmatski
produžeci sastavljeni od brojnih paralelnih glijalnih fila-
menata formirajući gustu mrežu oko njih (11).

Ranija istraživanja su pokazala da se tokom starenja
pored povećanog nagomilavanja pigmenta (lipofuscina i

melanina) u pinealocitima (12,13), smanjenja celularnosti žlezde, pojave kalcifikata u parenhimu žlezde, pojave cisti (14,15), uočava se i pojava glioze. Najčešća lokalizacija glijalnog tkiva je uočena oko cisti, ali su nađena i područja različite veličine u samom parenhimu žlezde (14).

Do sada, u brojnim radovima na životinjama je potvrđeno da su, pored glijalnog fibrilarnog proteina (GFAP), S-100 protein i vimentin (VIM) prepoznati kao glijalni markeri. Njihova ekspresija u pinealnoj žlezdi se uočava u intersticijalnim ćelijama pinealne žlezde (16-18).

S-100 protein je kalcijum vezujući protein kojeg je 1965.godine izolovao B.W. Moore, a već sledeće je potvrđeno da je pozitivan u glijalnim ćelijama (19-20). Ime ovog proteina proizilazi iz njihove rastvorljivosti u 100% saturisanom rastvoru amonijum sulfata gde je pH neutralan. Do danas je identifikovano najmanje 25 proteina koji pripadaju porodici S-100 proteina, a od njih najmanje 21 su geni koji su locirani na hromozomskom lokusu 1q21. Za razliku od velikog broja S-100 proteina kod kičmenjaka, oni se uopšte ne nalaze kod beskičmenjaka (21). Najviše izučavana su dva podtipa i to: S-100 α i S-100 β . Imunoekspresija S-100 β i nivoi u serumu su poznati u brojnim kliničkim stanjima kao što su: povrede mozga, subarahnoidalno krvarenje, Alzheimer-ova bolest, a takođe se smatra markerom astrocitne aktivacije (22).

Kako pretraživanjem dostupne literature nisu uspešno pronađeni podaci vezani za ekspresiju ovog markera u pinealnim žlezdama zdravih ljudi, cilj ove studije je praćenje ekspresija markera S-100 u tkivu humane pinealne žlezde, kao i utvrđivanje razlika u ekspresiji S-100 u zavisnosti od pola i u zavisnosti od starosne dobi.

MATERIJAL I METODE

Materijal

Istraživanje je obuhvatilo 26 uzorka humanih pinealnih žlezda dobijenih obdukcijom leševa na Institutu za sudsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu. Uzorci su podeljeni u dve starosne grupe i to: I grupa (n=13) – obuhvatala je pinealne žlezde ljudi mlađih od 50 godina, i II grupa (n=13) – sa pinealnim žlezdama ljudi starijih od 50 godina.

Histološka obrada tkiva

Pinealne žlezde su nakon uzorkovanja fiksirane u puferisanom formalinu (pH=7,4). Potom su dekalcinisane u 14% rastvoru EDTA, nakon toga dehidrirane u rastućim koncentracijama etanola (70%, 80%, 96%, 100%), pa kalupljene u parafinske blokove. Nakon kalupljenja, sečene su na mikrotomu marke Leica pri debljini reza od 5 μ m. Preparati su bojeni standardnom hematoksilin-eozin (H&E) histološkom bojom, kao i metodama imunohistohemije.

Imunohistohemijsko bojenje

Za svaku grupu su za imunohistohemijsko bojenje tkiva primenjena primarna antitela za marker S100 β (Abcam), prema sledećem protokolu: nakon rehidracije isečaka, sprovedena je "retrival" reakcija koja podrazumeva zagrevanje isečaka u citratnom puferu (pH=6,0) na 850W u mikrotalasnoj peći tokom 20 minuta nakon čega su preparati

ohlađeni u trajanju od 30 minuta. Po završetku hlađenja iseći su isprani četiri puta u puferu (TBS, pH=7,4) i inkubirani 2 sata sa 10% normalnim kozijim serumom radi blokiranja nespecifičnog bojenja. Nakon toga je na preparate aplikovano odgovarajuće primarno antitelo i ostavljeno na 4°C preko noći. Sledećeg dana preparati su na sobnoj temperaturi inkubirani 15 minuta sa 0,3% H₂O₂ radi eliminisanja aktivnosti endogene peroksidaze, a zatim 1 sat sa HRP (*horseradish peroxidase*) konjugovanim sekundarnim antitelom. Za vizuelizaciju pri imunohistohemijskom bojenju korišćen je DAB hromogen. Kontrastno bojenje je načinjeno sa Majerovim hematoksilinom.

Morfometrijska merenja

Preparati su analizirani na mikroskopu marke Leica DMLB 100T i fotografisani kamerom marke Leica MC 190. Za svaku pinealnu žlezdu je uslikano 5 nasumično odabranih vidnih polja pri uveličanju 400x. Potom je pomoću kompjuterskog programa *Fiji* uz pomoć *Plugin*-a pod imenom *Cell count* određen broj glijalnih ćelija pinealne žlezde, ukupan broj ćelija pinealne žlezde kao i površina na kojoj su se te ćelije nalazile.

Statistička obrada podataka

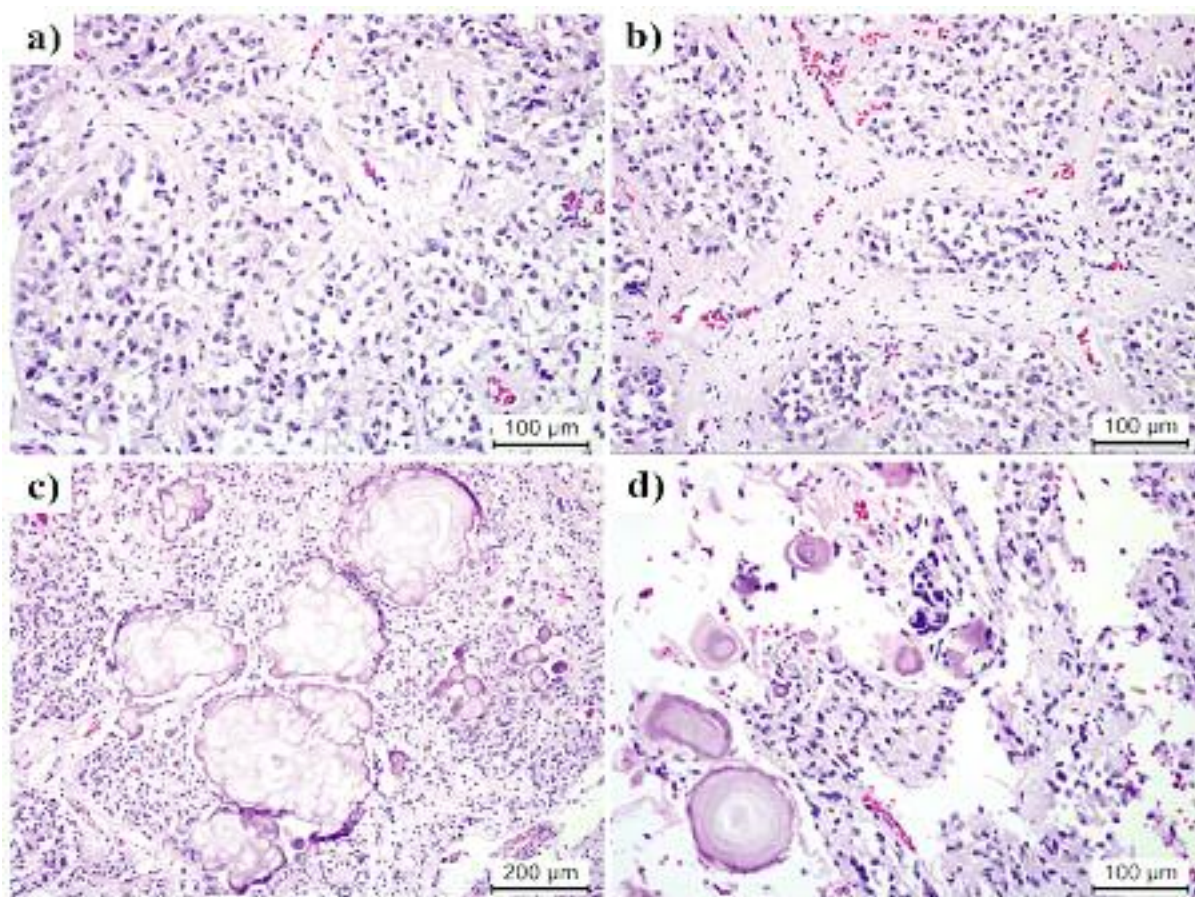
Prikupljeni podaci su analizirani primenom statističkog programa IBM SPSS Statistics 20.0. Poređenje medijana procenta glijalnih ćelija, ukupnog broja ćelija i broja glijalnih ćelija po jedinici površine u odnosu na pol i starosnu grupu vršeno je uz pomoć neparametarskog Mann-Whitney testa. Vrednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

REZULTATI

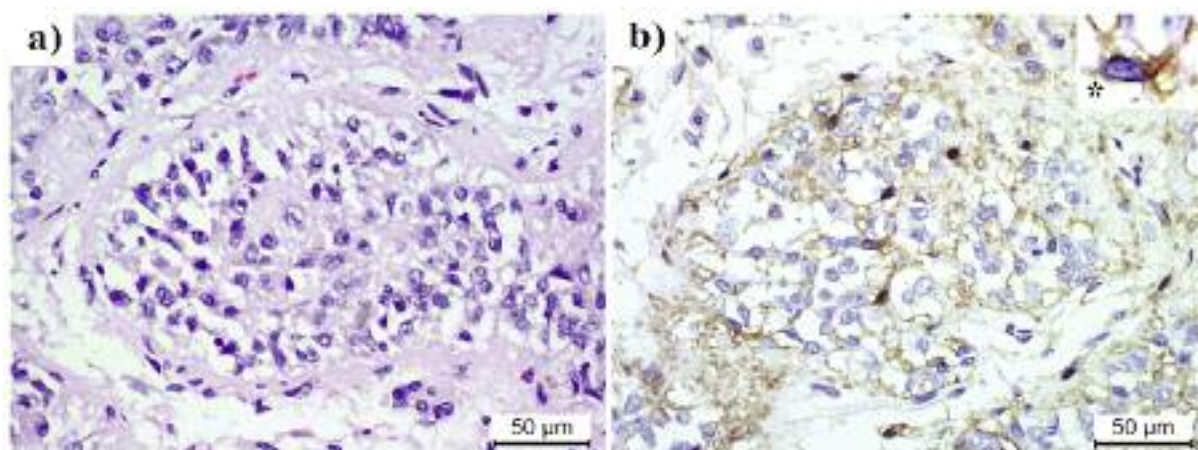
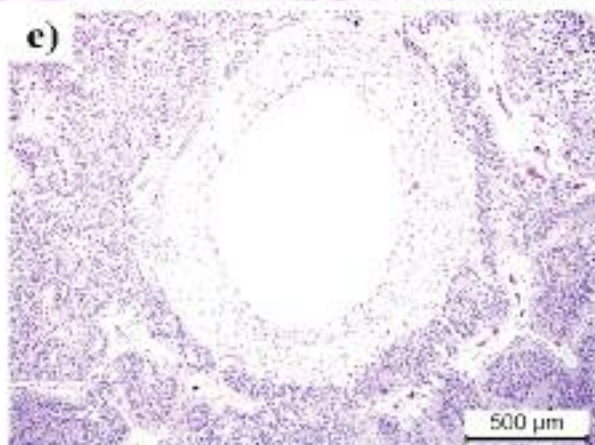
Analizom histoloških preparata se uočava parenhim pinealne žlezde uobičajene histološke građe sa lobulusima koji su ograđeni sa manje ili više izraženim septama (Slika. 1a,1b). Najučestaliji histološki nalaz predstavlja prisustvo kalcifikacija (moždanog peska - *corpora arenacea*) čija građa zavisi od lokalizacije u pinealnoj žlezdi. Globularna građa (Slika. 1c) se javlja kod kalcifikata koji se nalaze unutar samog parenhima pinealne žlezde. Kalcifikati lamelarne građe (Slika. 1d) su lokalizovan na površini žlezde u okviru meningeja. Pored toga česta je i pojava cističnih formacija unutar parenhima žlezde, okruženih sa glijalnim tkivom (Slika. 1e).

Analizom dobijenih morfometrijskih podataka uz pomoć Mann-Whitney testa dobijeni su sledeći rezultati. Procenat glijalnih ćelija, ukupni broj ćelija i broj glijalnih ćelija po jedinici površine nisu pokazali nikakvu bitnu statistički značajnu razliku u odnosu na pol. U odnosu na starosne grupe, nije dokazana nikakva bitna statistički značajna razlika kod broja glijalnih ćelija po jedinici površine. Međutim u slučaju ukupnog broja ćelija po jedinici površine uočena je bitna statistički značajna razlika između starosne grupe I i starosne grupe II. Kod ljudi mlađih od 50 godina, uočen je povećan ukupni broj ćelija po jedinici površine (Medijana = 2517,14 ćelija/mm²) (Grafikon 1.).

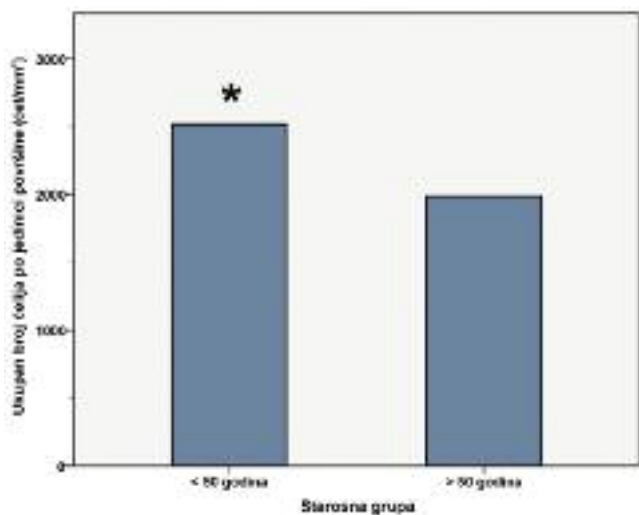
Takođe je i kod procenta glijalnih ćelija dokazana bitna statistička značajnost u odnosu na starosnu dob. Naime procenat glijalnih ćelija je povećan kod grupe II (Medijana



Slika 1. Histološka građa pinealne žlezde: a) pinealni parenhim ograničen manje izraženim septama, 200x, HE; b) pinealni parenhim ograničen više izraženim septama, 200x, HE; c) globularni (intraparenhimski tip) kalcifikata, 200x, HE; d) lamelarni (ekstraparenhimski) kalcifikati, 200x, HE; e) cista okružena glijalnim tkivom; 50x, HE.



Slika 2. Lobulus pinealne žlezde: a) HE, 400x; b) S-100, 400x (*S-100 pozitivna ćelija).



Grafikon broj 1. Medijana ukupnog broja ćelija po jedinici površine (* $p < 0,05$)

= 13,31%), odnosno kod grupe sa pinealnim žlezdama ljudi starijih od 50 godina (Grafikon 2.).

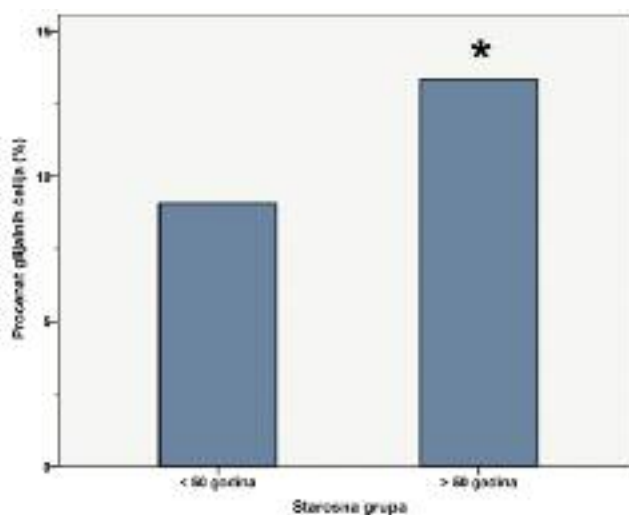
DISKUSIJA

Povećana lobulacija parenhima, veći stepen kalcifikacije, fibroza i gliozna su najčešće potvrđeni nalazi u pinealnom parenhimu tokom starenja. Prema literaturnim navodima smanjenje celularnosti u blagom stepenu je uočeno samo u muškaraca nakon starosti od 44 godine (14, 23, 24). Kao i da se broj pinealocita smanjuje sa starenjem za 18% (25). Naša studija potvrđuje rezultate literaturnih navoda, gde je uočeno da je ukupan broj ćelija pinealne žlezde statistički značajno veći u grupi ljudi mlađih od 50 godina, dok među polovima ne postoje statistički značajne razlike u ukupnom broju ćelija.

Mnoga istraživanja navode da se stepen glioze povećava sa godinama kako kod žena tako i kod muškaraca (26-29). Iz naše studije proizilaze podaci da je procenat glijalnih ćelija statistički značajno veći kod osoba starijih od 50 godina u odnosu na osobe mlađe od 50 godina, dok razlike u procentu glijalnih ćelija u odnosu na pol nisu pokazale bitnu statističku značajnost.

Na humanom tkivu pinealne žlezde postoje podaci o ekspresiji glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP markera) u periodu od 28 nedelja starosti pa do 91 godine života. Tačnije u 28 nedelji života uočava se slaba tačkasta pozitivnost, dok u 36 nedelji se vide jasno uobličeni astrociti sa slabo razvijenim citoplazmatskim produžecima. I astrociti i mreža produžetaka postaje izraženija sa godinama [30], što se podudara sa rezultatima naše studije sa tim da se u našoj studiji za prikazivanje glijalnih ćelija koristio imunohistohemijski marker S100β.

U istraživanjima sa životinjama utvrđeno je da se kod pinealne žlezde pacova već u prvom postnatalnom danu uočava slaba ekspresija S-100 markera, dok se već petog postnatalnog dana uočavaju brojne imunopozitivne ćelije i to u predelu pinealnog recesusa i na površini same žlezde (31). Takođe je potvrđena veoma slična imunoreaktivnost S-100 i GFAP markera, gde imunopozitivne ćelije od svog tela pružaju citoplazmatske produžetke koji formiraju mrežu oko



Grafikon broj 2. Medijana procenta glijalnih ćelija u odnosu na starosnu dob (* $p < 0,05$)

pinealocita kako kod pacova tako i kod pinealnih žlezda magaraca (32-34).

Na pinealnom tkivu krava imunoreaktivnost S-100 je uočena kako u telu, tako i u citoplazmatskim produžecima glijalnih ćelija sa većim intenzitetom kod starijih životinja. Podaci iz ove studije pokazuju sličnost sa našim rezultatima po pitanju imunoreaktivnosti i lokalizacije obojenih glijalnih ćelija na periferiji žlezde kao i u okolini krvnih sudova (18).

U tumorima pinealnog parenhima imunohistohemijskim analizama potvrđeno je da su glijalne (intersticijalne) ćelije pokazale imunopozitivnost kako na GFAP i S-100 protein, tako i na vimentin (35).

Naša studija je pokazala da glijalne ćelije humane pinealne žlezde čoveka pokazuju imunopozitivnost na imunohistohemijski marker S-100β. Iz podataka dobijenih ovim istraživanjem možemo zaključiti da se procenat glijalnih ćelija povećava kod čoveka tokom starenja, kao i da je kod mlađih ljudi pinealni parenhim celularniji. S obzirom na oskudan broj podataka, u dostupnoj literaturi, o imunohistohemijskim karakteristikama humane pinealne žlezde smatramo da bi buduća istraživanja na tom polju znatno pomogla u razumevanju, iako poznate od davnina, ove još nerazotkrivene enigme.

Zahvalnica

Ovo istraživanje radi se u okviru projekta OI – 175006, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Srbije.

Abstract

Introduction: The pineal gland represents a neuroendocrine organ. Gland parenchyma is composed of higher percentage of pinealocytes and about 5% of glial cells. Earlier studies showed that there is reduced cellularity of gland, gliosis and higher percentage of calcification during aging in addition to increased accumulation of pigments in pinealocytes.

Aim: Aim of this study was to monitor the expression of marker S-100β in tissue of human pineal gland, as well as identification of differences in expression of the same marker depending on the sex and according to age.

Material and Methods: The study included 26 samples which were divided into two groups: group I (n=13) included the pineal glands of people younger than 50 years and group II (n=13) pineal glands of people older than 50 years. After histological processing of samples, sections were stained with hematoxylin-eosin stain and immunohistochemically with anti - S-100β antibody. The number of glial cells of the pineal gland was determined, also with the total number of cells per unit area. In data processing we used Mann-Whitney test and statistically significant value was considered p<0,05.

Results: There was an increased total number of cells per unit area in people younger than 50 years. Percentage of glial cells was increased in people older than 50 years.

Conclusion: The glial cells of the human pineal gland showed S-100β positive staining. During aging the percentage of human glial cells was increased, while pineal parenchyma in younger people was more cellular.

LITERATURA

1. Scharenberg K, Liss L. The histologic structure of the human pineal body. *Progress in brain research*. 1964;10:193-217.
2. Erlich S, Apuzzo M. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *Journal of neurosurgery*. 1985;63(3):321-41.
3. Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 698-700.
4. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic histology: text & atlas*. 10th ed. USA:McGraw-Hill Companies; 2003. p. 430).
5. Møller M, Baeres F M. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* (2002) 309:139–150.
6. Arendt J. Melatonin. *Clinical endocrinology*, 1988, 29,2: 205-229.
7. Reiter RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays*, 1992;14: 169–175;
8. Regodón S, Franco A, Masot J, Redondo E. Structure of the ovine pineal gland during prenatal development. *J Pineal Res*. 1998; 25:229–239.
9. Calvo J, Boya J. Postnatal development of cell types in the rat pineal gland. *Journal of Anatomy*. 1983;137(Pt 1):185-195.
10. Stein BM, Fetell MR, Duffy PE. Immunocytochemistry of pineal astrocytes: species differences and functional implications. *JNEN* 1985, 44 (5) 486-495.
11. Shimada H. Ultrastructural study of the human pineal gland in aged patients including a centenarian. *Actapathologica japonica*. 1990;40(1):31.
12. Galliani I, Frank F, Gobbi P, Giangaspero F, Falcieri E. Histochemical and ultrastructural study of human pineal gland in the course of aging. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1989;21(3):571-8.
13. Koshy S, Vettivel S. Melanin pigment in human pineal gland. *J Anat Soc India*. 2001;50:122-6.
14. Tapp E, Huxley M. The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. *J Pathol*. 11972;108:137-44.
15. Hasegawa A, Ohtsubo K, Mori W. Pineal gland in old age; quantitative and qualitative morphological study of 168 human autopsy cases. *Brain Res* 1987;409:343-9.
16. Møller M, Ingild A, Bock E. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res* 1978;140:1-13.
17. Huang SK, Nobiling R, Schachner M, Taugner PDR. Interstitial and parenchymal cells in the pineal gland of the golden hamster. *Cell and tissue research*, 1984;235(2):327-337.
18. Esteban G, Muñoz MI, Carbajo S, Carvajal JC, Alvarez-Morujó AJ, Barragán, LM. Pineal gliosis and gland ageing. The possible role of the glia in the transfer of melatonin from pinealocytes to the blood and cerebrospinal fluid. *Eur J Anat*. 2008; 12(1):97-114.
19. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. biophys. Res. Commu H.*. 1965;19:739-744.
20. Hyden H, McEwen BS. A glial protein specific for the nervous system. *Proc. nat. Aead. Sei.(Wash.)*. 1966;55:354-8.
21. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003; 60:540-551.
22. Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 2008;12(4):198-204.
23. Wildi R, Frauchiger E. Modifications histologiques de l'épiphyse humaine pendant l'enfance, l'âge adulte et le vieillissement. *Prog. Brain Res*. 1965;10:218-223.
24. Trentini GP, De Gaetani EF, Pierini G, Criscuolo M, Vidyasagar RJ, Fabbri F. Some aspects of human pineal pathology. In: Reiter R.J., Karasek M. (Eds.), *Advances in pineal research: 1*. John Libbey, London-Paris, 1986, pp. 219-229.
25. Khavinson, VK, Linkova NS. Morphofunctional and molecular bases of pineal gland aging. *Human Physiology*. 2001;38(1):101-107.
26. Tapp E. The Human Pineal Gland in Malignancy. *J. Neural Transmission*. 1980;48:119—129.
27. Horanyi B. Das corpus pineale im senium. *Wnr. Zeitschr. Nervenheilk*. 1960;16:129-139.
28. Boya J, Calvo J. Structure and ultra-structure of the aging rat pineal gland. *J. Pineal Res*. 1984;1:83-89,
29. Singh R, Ghosh S, Joshi A, Haldar C. Human pineal gland: Histomorphological study in different age groups and different causes of death. *Journal of the Anatomical Society of India*. 2014;30:1-5
30. Papanosomenos, SC. Glial fibrillary acidic (GFA) protein-containing cells in the human pineal gland. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1983;42(4):391-408
31. Bastianelli E, Pochet R. Calbindin D28k, calretinin, and S-100 immunoreactivities in rat pineal gland during postnatal development. *Journal of pineal research*. 1995;18(3):127-134.
32. Borregón A, Boya J, Calvo JL, López-Muñoz F. Immunohistochemical study of the pineal glial cells in the postnatal development of the rat pineal gland. *Journal of pineal research*. 1993;14(2):78-83.
33. Suzuki T, Kachi T. Immunohistochemical studies on supporting cells in the adrenal medulla and pineal gland of adult rat, especially on S-100 protein, glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy*. 1995;70(2):130-139.
34. Ebada, S. Morphological and Immunohistochemical Studies on the Pineal Gland of the Donkey (*Equus asinus*). *J. Vet. Anat*. 2012;5(1):47-74.
35. Yamane Y, Mena H, Nakazato Y. Immunohistochemical characterization of pineal parenchymal tumors using novel monoclonal antibodies to the pineal body. *Neuropathology*. 2002;22(2):66-76.

■ Rad je primljen 14.12.2016 ./ Prihvaćen 22.12.2016.