

DOI 10.7251/VETJSR001N

UDK 591.18.084:537.531

Оригинални научни рад

КАРАКТЕРИСТИЧНЕ МОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ У МОЗГУ СТАРИХ ПАСА

Слађан НЕШИЋ*, Дарко МАРИНКОВИЋ, Владимир КУКОЉ, Ивана ВУЧИЋЕВИЋ, Милан АНИЧИЋ, Сања АЛЕКСИЋ КОВАЧЕВИЋ

Катедра за патологију, Факултет ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, Србија

* Коресподентни аутор: Слађан Нешић, sladjan@vet.bg.ac.rs

Сажетак: Старење ткива мозга је природни универзални процес који прате бројне морфолошке промене. Поједине карактеристичне старосне промене су макроскопски видљиве, док се већина може открити хистолошком анализом.

Циљ испитивања је утврђивање и описивање карактеристичних промена, у мозгу старијих паса.

У испитивању је коришћено мождано ткиво 36 паса који су подељени у две групе. Након обдукције мождано ткиво паса је фиксирано у формалину и стандардно процесуирано. Ткивни исечци су бојени методама: хематоксилин еозин, конго црвено, ПАС и имунохистохемијском техником стрептавидин-биотин (ЈСАБ2). Од примарних антитета коришћена су: поликлонско антитело и моноклонско за бета амилоид (А β 1-14/А β 1-42), моноклонско антитело за убиквитин, моноклонско антитело за металотионеин I и II.

У мозгу паса експерименталне групе макроскопски је уочено задебљање лептоменинги, кортикална атрофија са сужењем вијуга и проширењем бразда и проширење латералних можданих комора. Микроскопским прегледом можданог ткива установљено је: фиброза менинги и зидова крвних судова, неуронофагија, сателитоза, астроцитоза, астроглиоза, депозити амилоида, накупине липофусцина, присуство убиквитинских гранула и полиглукозанских тела. Најчешће захваћени делови мозга старосним променама су хипокампус, фронтална и паријетална кора. Накупине амилоида су доказане методом бојења конго црвеног и имунохистохемијски у зиду церебралних крвних судова и можданом паренхиму.

У процесу старења у нервном систему паса настају бројне промене, које захватају све чиниоце нервног ткива као што су неурони, глија ћелије, крвни судови и менинге. Због сличности са старосним променама у можданом ткиву паса и људи, пас се може користити за њихово боље разумевање и описивање као експериментални модел за даља испитивања.

Кључне речи: амилоид, липофусцин, мозак, пас, старосне промене.

УВОД

Процес старења је универзални биолошки процес током којег долази до нарушавања хомеостазе у организму. У мозгу старих паса настају промене на можданом паренхиму, менингама, хориоидним плексусима и крвним судовима (Нешић и сар., 2017; Dimakopoulos и Mayer, 2002). Макроскопске промене су смањење можданих хемисфера (сужења вијуга и проширења бразда), задебљање и калцификација можданица, проширење латералних комора и друго (Dimakopoulos и Mayer, 2002). Хистолошке промене у можданом паренхиму старих паса су акумулација амилоида, промене на неуронима и глија ћелијама, задебљање зида крвних судова депоновање липофусцина и друге (Нешић и сар., 2017; Dimakopoulos и Mayer, 2002). У литератури је утврђено је да се старосне промене у мозгу паса одвијају се спонтано и лагано, при чему су запажене одређене сличности са променама у мозгу код људи (Pirici и сар., 2011). Амилоид се накупља и екстрацелуларно у паренхиму мозга у виду плакова. Литературни подаци указују на присуство сенилних плакова и депозита амилоида у зиду крвних судова у мозгу великог броја животињских врста, на пример као што су мајмуни, пси, медведи, мачке и камиле (Pirici и сар., 2011). Поједини аутори сматрају да се амилоид може локализовати у нервним ћелијама (Head и сар., 2010; Head и сар., 2008). Бројни резултати истраживања указују да је амилоид неуротоксичан, јер стимулише развој оксидативног стреса у ћелији. Оксидативни стрес је пратилац старосних промена и изазива дегенерацију неурона (Vargas и сар., 2010; Fukui и сар., 2007; Devi и сар., 2006; Figueroa и сар., 2006). Протеини који учествују у одбрани ћелија од оксидативног стреса су металотионеини. Они су протеини који су у ћелији носачи тешких метала као што су бакар и цинк и тако их неутралишу. Постоје три групе металонеина (MT) са специфичним улогама MT I и II неутралишу пероксинитрат, а MT III хидроксидни радикал и пероксинитрат (Uchida, 2010; Uchida и сар., 2002). Разградњу истрошених протеина у ћелији обавља систем убиквитин протеазоми. (Giannini и сар., 2013; Bingol и Schuman, 2005). Нарушавањем функционисања система убиквитин-протеазоми могу се развити неуродегенеративна обољења људи (Uradhya и Hegde, 2007). Поремећаји у функционисању система убиквитин-протеазоми доводе до непотпуне деградације протеина, липида и оштећених органа, а њиховим сједињавањем формирају се несварљиве липофусцинске грануле (Gray и Woulfe, 2005). Липофусцин је „старачки“ пигмент, а настаје у процесу старења у постмитотичким дугоживећим ћелијама (Jung и сар., 2010; Gray и Woulfe, 2005).

Циљ истраживања је било утврђивање и одређивање делова мозга паса у којима се манифестују карактеристичне старосне промене. Такође, циљ истраживања је било и описивање хистолошких промена.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

За испитивање је коришћено 36 обдукованих паса, при чему је шест паса старости до пет година коришћено као контролна група док је осталих 30 паса су старости преко десет година сврстано у експерименталну групу. Након извршене обдукције мозгови паса су фиксирани 72 часа у 10% неутралном формалину, после тога су сечени по коронарним резovima и фиксирани још 24 часа. За испитивање су одабрани фронтална кора, паријетална кора, хипокампус, мали мозак и продужена мождина леве половине мозга. По завршеној фиксацији извршено је моделирање ткива и процесуирано стандардном методом припреме ткива за бојење. Припремљени ткивни исечци су бојени следећим методама бојења: хематоксилин-еозин, конго-црвено, техником перјодне киселине - Schiff (Periodic acid Schiff, енг.- ПАС) и имунохистохемијски. Припрема хистолошких препарата, хистохемијска и имунохистохемијска бојења испитиваног можданог ткива је обављена на Катедри за патологију, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. Анализа обојених препарата је обављена помоћу светлосног микроскопа (Olympus, BX51). Препарати обојени конго црвеним анализирају се и под поларизационим светлом. Поједини обојени препарати са карактеристичним налазима старосних промена одабрани и урађене су дигиталне фотографије помоћу светлосног микроскопа (Olympus, BX51) са дигиталном камером (Olympus ColorView III).

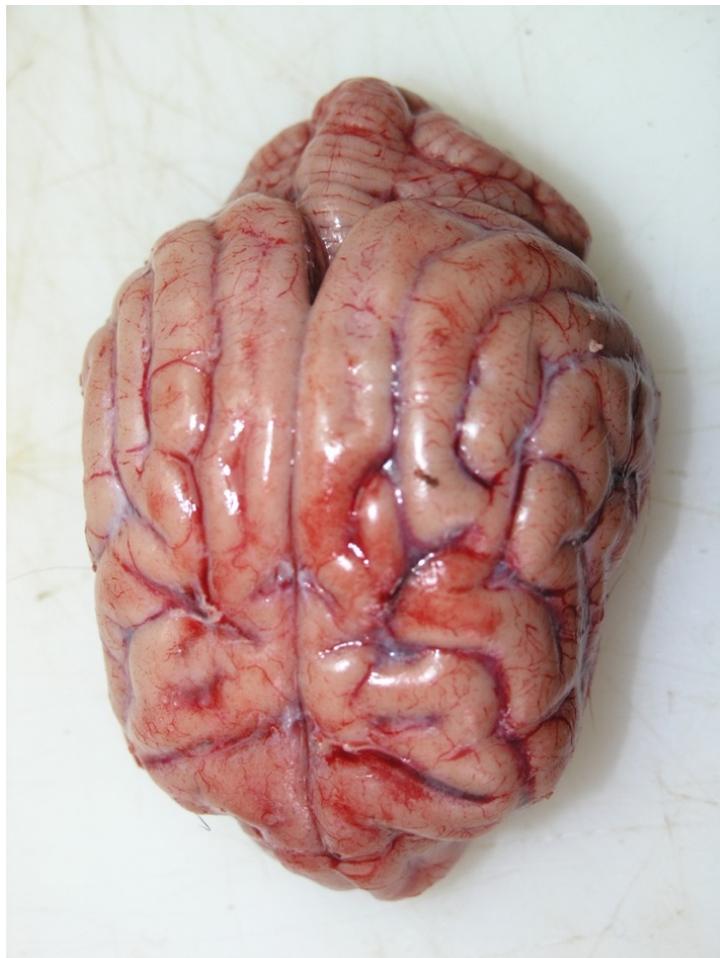
У сврху имунохистохемијског испитивања коришћена је тростепена индиректна метода уз адекватно демаскирање антигена тј. имунохистохемијско бојење применом стрептавидин-биотин технике (комерцијални кит Labelled стрептавидин-биотин LSAB 2 метода, ДАКО, Данска) а од примарних антитела употребљена су: поликлонско антитело за бета амилоид (A β 1-14, 1:400, произвођач ABD serotec), антитело за бета амилоид (A β 1-42, 1:500, произвођач Invitrogen), моноклонско антитело за убиквитин (1:3000, произвођач ABD serotec), моноклонско антитело за металотионеин (1:50, произвођач ДАКО). Демаскирање је вршено термички, протеолитички или инкубацијом у мрављој киселини. Инхибиција ендogene пероксидазе је обављена употребом раствора 3% H₂O₂ у метанолу 15 минута. Током имунохистохемијског бојења за сва испирања коришћен је фосфатни пуфер (PBS, рН 7,2-7,4). У фази преинкубације у трајању од 20 минута, коришћен је 25% козји серум. Примарна антитела су инкубирана у влажној комори на собној температури 60 минута. После испирања ткивни исечци су третирани компонентама кита за детекцију (Дако, Cytomation, LSAB 2). За визуелизацију насталог комплекса антиген-антитело коришћен је хромоген диаминобензидин (DAB⁺, ДАКО).

У мозговима паса испитване су следеће хистолошке промене: глиоза (астроглиоза и астроцитоза), сателитоза и неуронофагија, накупљање патолошких протеина у зиду крвних судова, депозити амилоида и липофусцина, присуство металотионеина и убиквитина. За доказивање депозита амилоида

ткивни препарати су бојени имунохистохемијски и хистохемијском методом конго црвеним. Липофусцин је доказиван бојењем ткивних исечака ПАС методом. Испитивање присуства убиквитина и металотионеина је обављено имунохистохемијским бојењем.

РЕЗУЛТАТИ

Од макроскопских промена на мозгу паса само експерименталне групе су уочене атрофија (сужење) вијуга (gyri, лат.), проширење бразда (sulci, лат.) и латералних комора и дифузно задебљање лептоменикса (leptomeningx, лат.). Сужење вијуга и проширење бразда пронађено је у мозговима искључиво код најстаријих паса старости између 16,5 и 18 година. (Слика 1.).

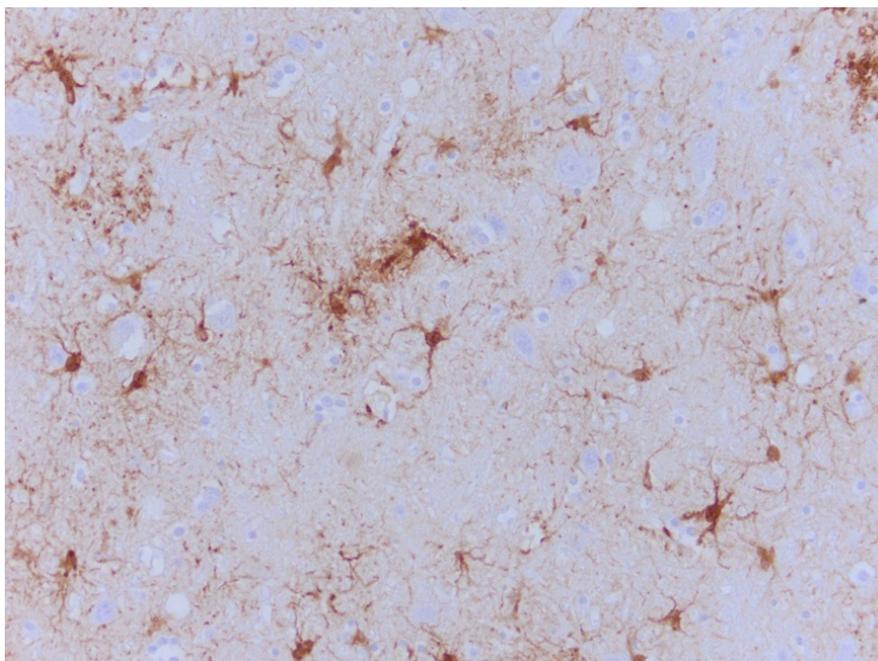


Слика 1. Пас, мешанац, 17 година, макроскопски изглед мозга можданица (задебљање беличасто замућена поља)

Атрофија можданих вијуга са последичним проширењем бразда установљена је код 5 (16,67%) паса из експерименталне групе. Благо проширење латералних комора је дијагностиковано код свих паса старијих од 15 година (19 паса из експерименталне групе, 63%). Дифузно задебљање меке можданице је

установљено код 23 старија пса (76%). Задебљање лептоменингса се јасно уочава у нивоу можданих вијуга у виду беличастог замућења менинги.

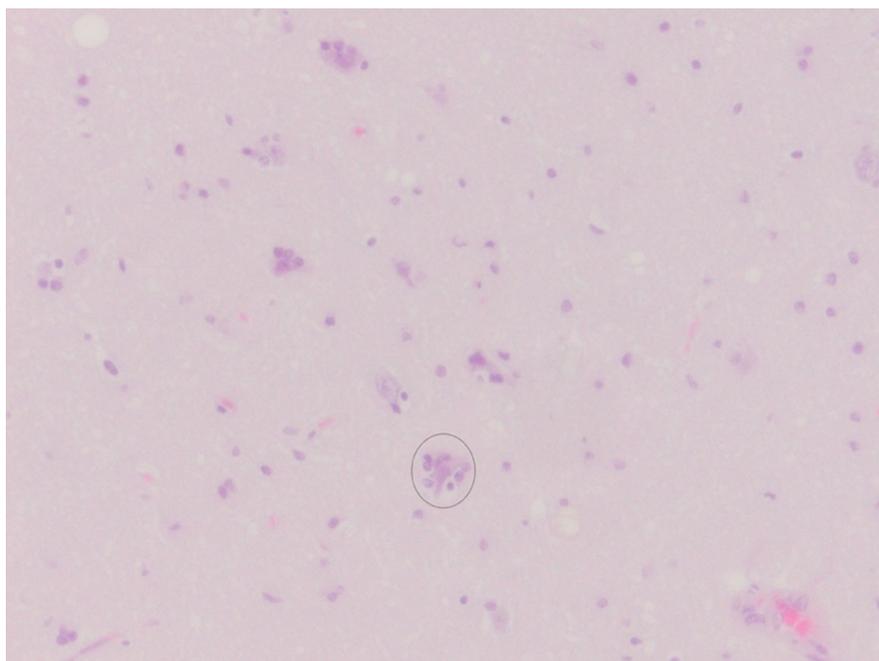
Глиоза представља глијалну хиперцелуларност у централном нервном систему, која настаје због пролиферације и/или хипертрофије глија ћелија. Ткивни исечци су бојени хематоксилин еозин методом као и имунохистохемијски на металотионеине у циљу утврђивања промена на астроцитима. У ЦНС-у контролне групе паса глиоза је установљена у фронталној и паријеталној кори (50%) и продуженој мождини (33,33%) Код паса експерименталне групе за разлику од контролне групе глиоза је установљена у свим испитиваним деловима ЦНС-а, а најчешће захваћени део мозга је била фронтална кора старих код 25 паса (83,33%). Глиоза се у испитиваном можданом ткиву манифестовала се у виду промена на астроцитима. Промене на астроцитима могу се испољити у два облика а то су астроглиоза и астроцитоза. Астроцитоза је термин који означава повећање броја астроцита а астроглиоза њихову хипертрофију. Имунохистохемијским бојењем испитиваног можданог ткива паса на металотионеине I и II установљено је да се чешће јавља астроглиоза од астроцитозе. Имунопозитивни астроцити на металотионеине код већине паса су били повећаног обима (хипертрофисани) (Слика 2).



Слика 2. Пас, лабрадор, 13 година, продужена мождина, имунохистохемијско бојење антитело металотионеин I и II у астроцитима (браон боје), повећање 400X.

Код паса из експерименталне групе у различитим деловима ЦНС-а астроглиоза је детектован 80 - 87,5%, а астроцитоза 30-37,5% случајева. Обе промене су биле заступљеније у белој супстанци него у сивој супстанци. Интензитет позитивног

сигнала при имунохистохемијском бојењу на металотионеине је јачи код старијих животиња односно глијане промене су интензивније код старијих паса. Сателитоза и неуронофагија (Слика 3) су два процеса у ЦНС-у који прате један други и показатељи су да је дошло до оштећења неурона услед дејства неке штетне ноксе или промене у перинеуроналној микроколини. Услед нарушавања хомеостазе неурона, активирају се перинеуронска сателит олигодендроглија, која хипертрофише и пролиферише а микроглија ћелије врше фагоцитозу оштећених неурона.



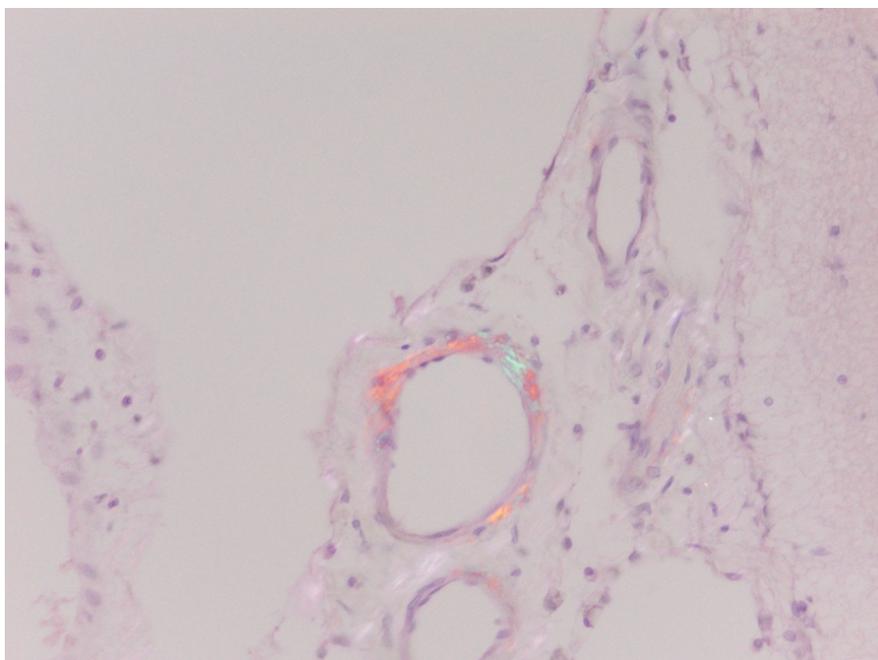
Слика 3. Пас, ирски сетер, 14 година, хипокампус, хематотксилин еозин метода, сателитоза и неуронофагија (круг), повећање 400X.

Код паса из контролне групе у испитивању је уочен мањи број ситних фокуса сателитозе и неуронофагије у фронталној кори и продуженој моздини код три пса, у паријеталној кори код два пса а у хипокампусу једног пса. За разлику од контролне групе у мозговима паса експерименталне групе сателитоза и неуронофагија су били фреквентији налази. Поменуте промене су најчешће детектоване у фронталној кори паса експерименталне групе (76,67%). Мали мозак је део ЦНС-а у коме нису запажени сателитоза и неуронофагија док су у осталим деловима били су присутни 30-70% (паријетална кора, хипокампус и продужена моздина).

Патохистолошким испитивањем на крвним судовима детектоване су фиброза зидова крвних судова и присуство депозита амилоида у зидовима крвних судова. Фиброза зидова крвних судова је уочена само код једног пса из контролне групе у хипокампусу, продуженој моздини и малом мозгу. У мозговима паса експерименталне групе фиброза зидова крвних судова је веома чест налаз у фронталној (70%) и паријеталној кори (63,33%) и хипокампусу (66,67%), док се

у мањем проценту јављала у малом мозгу (40%) и продуженој мождини (36,67%). Запажено је да су сви пси са фиброзом крвних судова у можданом ткиву старости преко 13 година.

Присуство депозита амилоида у мозговима паса доказивано је хистохемијским бојењем конго-црвеним (Слика 4.) и имунохистохемијским бојењем (Слика 5.). Присуство амилоида није доказано у мозгу паса контролне групе ни једном техником ни код једног пса. Међутим, у мозговима паса експерименталне групе депозити амилоида су доказани у зиду крвних судова и паренхиму методом бојења конго-црвеним и имунохистохемијском техником. Велика већина паса, у чијим паренхимима можданог ткива је доказано присуство амилоида, били су старији од 15 година.



Слика 4. Пас, мешанац, 17 година, фронтална кора, конго црвено бојење, амилоид у зиду менингеалног крвног суда (поларизациона светлост, флуоресцентно жуто-зелена боја), повећање 200X.

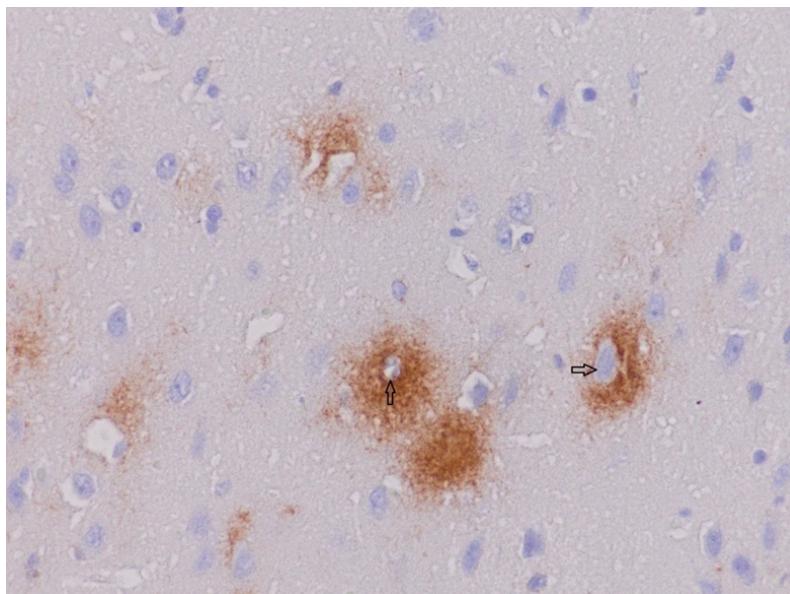


Слика 5. Пас, мешанац, 17 година, фронтална кора, имунохистохемијско бојење антитело А β 1-42, амилоид у менингеалним крвним судовима (браон боје), повећање 600X.

Хистохемијским бојењем конго-црвеним амилоида је детектован у зиду менингеалних и паренхимских крвних судова у свим испитиваним сегментима сем у продуженој моздини паса експерименталне групе. Депозити амилоида у облику дифузних плакова у можданом паренхиму паса се нису обојили конго-црвеним. Зидови крвних судова фронталне коре (63%) су најчешће захваћени са депозитима амилоида и били су позитивни бојењем конго-црвеним, а у најмањем проценту у малом мозгу (16,67%). У паријеталној кори и хипокампусу амилоид је конго-црвеним доказан у око 40% случајева. Код свих паса код којих је доказано присуство амилоида конго-црвеним, амилоид се налазио у зидовима менингеалних крвних судова. Депозити амилоид су доказани код 13 паса у фронталној кори у зидовима паренхимских крвних судова мозга паса експерименталне групе, паријеталној кори код 9 паса, хипокампусу код 7 паса и у малом мозгу код 4 пса.

Имунохистохемијски амилоид је доказан коришћењем два антитела: антибета амилоид (А β 1-14) и антибета амилоид (А β 1-42). У можданом ткиву паса амилоид је имунохистохемијски доказан у можданом ткиву паса експерименталне групе у три облика накупина: у зидовима крвних судова, у дифузним плаковим у паренхиму и интрацелуларно у неуронима. Сва три облика накупина амилоида су доказана антителом А β 1-14 док су са антителом А β 1-42 доказани депозити амилоида у можданим крвним судовима и у паренхиму у облику сенилних плакова. У неуронима депозити амилоида су детектовани антителом А β 1-14 у хипокампусу, фронталној и паријеталној кори код седам паса (Слика 6). Међутим неурони, позитивни на амилоид, били су дифузно распоређени у околини сенилних плакова, а не у њиховом центру. Најстарији пси

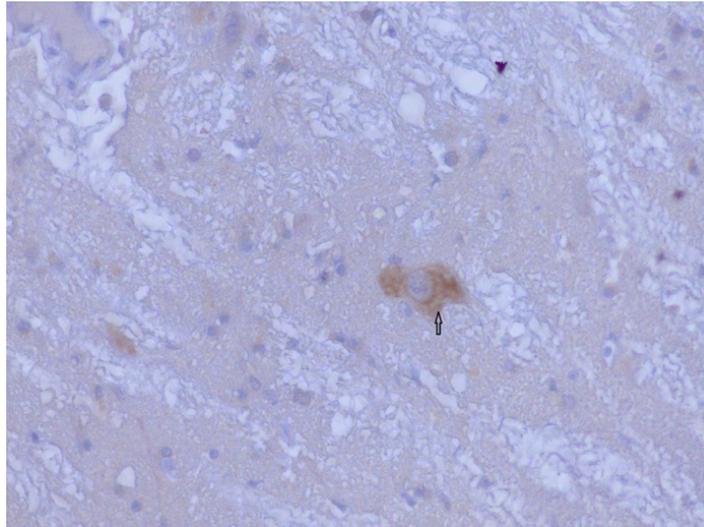
експерименталне групе су имали накупине амилоида у неуронима 5 паса старијих од 16 година, а два су била стара 13 година.



Слика 6. Пас, мешанац, 15 година, хипокампус, имунохистохемијско бојење антитело А β 1-42, амилоид у плаковима (браон боје), очувани неурони (стрелице), повећање 600X.

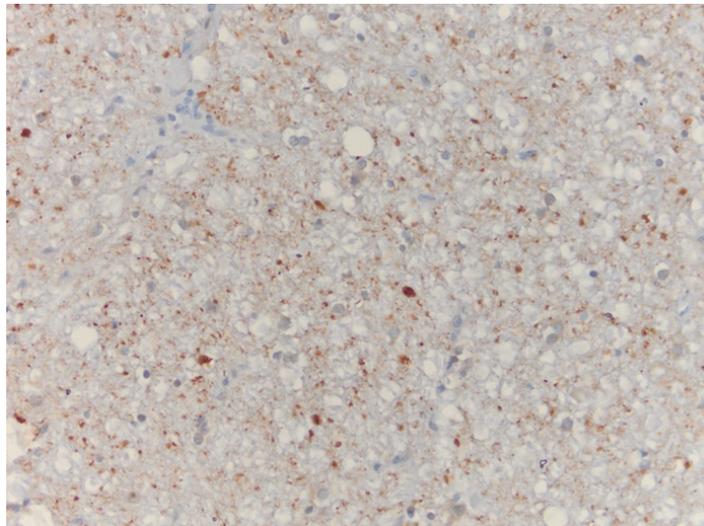
Зидови крвних судова менинги и паренхима су били позитивни на депозите амилоида. У неким крвним судовима депозити су окруживали у виду прстена цео крвни суд, а у неким су депозити били испрекидани. Амилоид није доказан у крвним судовима продужене мождине док је у осталим испитиваним регијама мозга јесте. Најчешће захваћене регије депозитима амилоида су на првом месту фронтална кора па затим следе паријетална кора и хипокампус и на крају је мали мозак. У менигеалним крвним судовима детектован је амилоид у фронталној регији 21 пса (70%), паријеталној регији код 16 паса (53,33%), хипокампусу код 15 паса (50%) и у малом мозгу код 5 паса (16,67%). Накупине амилоида су доказане у паренхимским крвним судовима мозга у фронталној кори код 70% паса, у паријеталној кори и хипокампусу код око 50% паса и у малом мозгу код 13,33% паса експерименталне групе.

Депозити амилоида у дифузним плаковима у мозговима паса доказани су са оба коришћена антитела и то код 19 паса (63,33%) са А β 1-14, а са А β 1-42 код 18 паса (60%). У центру појединих плакова су се налазили „заробљени“ очувани неурони. Неурони у оквиру дифузних плакова су били негативни на бета амилоид (Слика 7). Фронтална кора је регија мозга која је најчешће захваћена овом променом. У другим регијама мозга у којима је детектован амилоид, облик и величина плакова су варирали.



Слика 7. Пас, амерички стафордски теријер, 14 година, хипокампус, имунохистохемијско бојење антитело А β 1-14, амилоид у неуронима (браон боје, стрелица), повећање 600X.

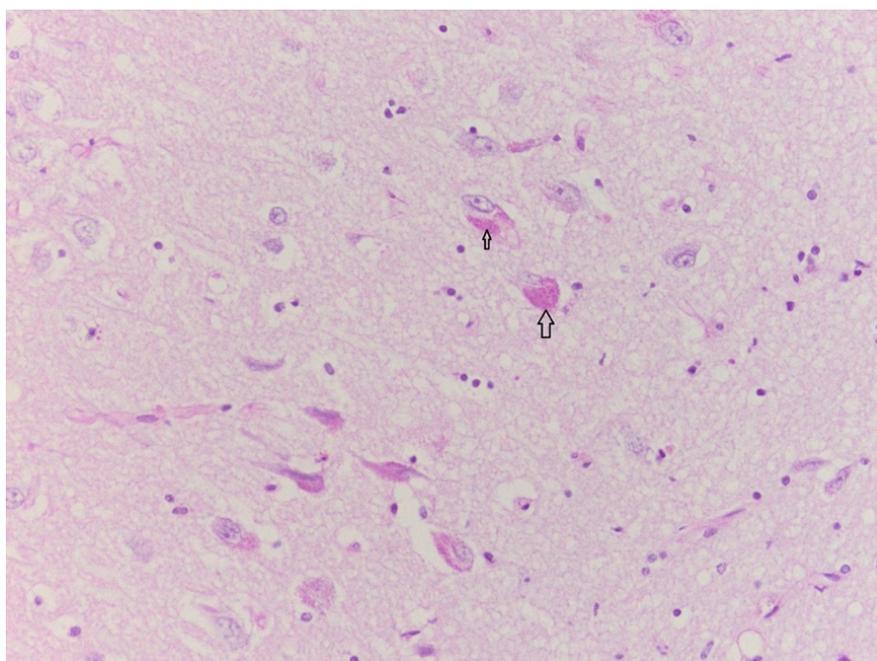
Позитивна убиквитин имунореакција није дијагностикована у мозговма паса контролне групе. У мозговима паса експерименталне групе у различитом проценту је детектован имунопозитивни сигнал на убиквитин. Убиквитин позитивне имунореакције су установљене у хипокампусу, фронталној и паријеталној регији код великог броја паса експерименталне групе (83-87%), док је у малом мозгу и продуженој моздини код 50% паса (Слика 8).



Слика 8. Пас, ирски сетер, 14 година, хипокампус, имунохистохемијско бојење антитело убиквитин, позитивна реакција у неуронима тамно браон боје, повећање 400X.

Старчки пигмент липофусцин је детектован у неуронима хематоксилин еозином и ПАС методом. На препаратима бојеним хематоксилин еозин методом

липофусцин има грануларну структуру која је нешто светлије боје од ружичасте боје цитоплазме. ПАС методом је такође липофусцин доказан у неуронима мозга старијих паса, тј. паса експерименталне групе (Слика 9). У свим испитиваним сегментима можданог ткива у различитим процентима доказане су накупине липофусцина у неуронима, а грануле липофусцина биле су смештене перинуклеарно као и у дендритском „стаблу“ и аксонском „брежуљку“.



Слика 9. Пас, мешанац, 18 година, хипокампус, ПАС метода, грануле липофусцин у неуронима црвене боје, повећање 400X.

У крупним неуронима појединих једара продужене мождине липофусцин је био присутан у 93,33% случајева, док је у осталим испитиваним сегментима процентуално између 56% и 74% паса експерименталне групе.

ДИСКУСИЈА

Код људи најчешће дијагностиковане макроскопске старосне промене на можданом ткиву су смањење мозга и проширење можданих комора. Сматра се да поменуте промене настају као последица губитка кортикалних неурона у процесу старења људи. Код животиња, за разлику од људи у литератури су макроскопске старосне промене у мозгу много ређе описиване. У нашем истраживању установљено је да се код паса старијих од десет година јављају атрофија можданих вијуга и проширење можданих бразда у 16,67% случајева, благо проширење можданих комора код 63% паса и задебљање лептоменинги код 76% паса. Добијени резултати указују на корелацију процеса старења и развоја макроскопских промена на мозгу. Хистолошки су установљене астроглиоза (око 80%), астроцитоза (око 35%), сателитоза и неуронофагија (око

75%). Овакви налази хистолошких промена заједно са макроскопским променама упућују на закључак да у можданом ткиву старијих паса јавља у значајнијој мери губитак неурона што може утицати на губитак функција захваћених делова мозга. У нашем испитивању је установљено да су код паса хипокампус, фронтална и паријетална кора од испитиваних сегмената мозга најчешће захваћени старосним промена. На основу ових чињеница може се код старијих паса очекивати смањење когнитивних способности што се дешава код старијих људи због развоја сличних старосних промена. Све наведено је у складу са литературним подацима у вези процесом старења.

Промене на крвним судовима у мозгу у процесу старења битно утичу на виталност неурона и глија ћелија а самим тим и на очуваност грађе и функција централног нервног система. Промене у процесу старења на крвним судовима могу да се јаве периваскуларно, у самом зиду или у лумену крвног суда. Најзначајније и најчешће промене у процесу старења се јављају у зиду можданих крвних судова, што утиче на промену у пропустљивости крвних судова. Промена у пропустљивости крвних судова доводи до нарушавања нормалног дотока глукозе и кисеоника до неурона и глија ћелија. Хипоксија и недостатак хранљивих материја оштећују ћелије централног нервног система (Dimakopoulos и Mayer, 2002).

У нашем испитивању фиброза зидова церебралних крвних судова је била веома чест налаз код старијих паса (до 70% паса из експерименталне групе). Најчешће захваћени сегменти фиброзом су хипокампус (66,67%), фронтални (70%) и паријетални (63,33%) режањ. Фиброза зида крвних судова у поменутих регијама утиче на промену у њиховој пропустљивости са последицим поремећајем дотока хранљивих материја свим ћелијама нервног ткива. Може се закључити да је фиброза старосно зависна промена јер је у нашем испитивању уочена код свих паса старијих од 13 година. Само код малог броја паса из експерименталне групе лумен појединих можданих крвних судова захваћених фиброзом је био сужен тј. само код најстаријих паса (старијих од 16 година). Облитерација малог броја крвних судова само код веома старих паса указује да се волумен крвних судова у можданом ткиву не смањује током процеса старења до последњих стадијума живота. Ово упућује на претпоставку да је главни узрок хипоксији и смањеном дотоку хранљивих материја неуронима и глија ћелијама у појединим деловима централног нервног система повећана пропустљивост крвних судова, услед нарушене архитектуре зидова крвних судова. Наши резултати су у складу са литературним подацима јер поједини аутори су доказали да је волумен крвних судова углавном очуван (Dimakopoulos и Mayer, 2002).

Најзначајнија промена у зиду можданих крвних судова је накупљање амилоида и означава се као церебрална амилоид ангиопатија (ЦАА). Код људи депозити А β срећу се нормално у процесу старења, код пацијената са фамилијарном ЦАА и код скоро свих пацијената са Алцхајмеровим обољењем (Kumar-Singh, 2008). У нашем испитивању је установљена акумулација амилоида у зидовима церебралних крвних судова код 70% паса старости преко 10 година. Наши

резултати су у складу са литературним подацима и на основу тога се може претпоставити да је ова промена старосно зависна (Нешић и сар., 2017).

Плакови или екстрацелуларне накупине амилоида у мозгу паса нису се обојиле методом конго-црвено, већ само имунохистохемијски. Ови резултати указују да су плакови присутни у можданом ткиву паса експерименталне групе изграђени од А β 42, што је у складу са литературним подацима о плаковима дифузног типа (Kumar-Singh, 2008; Dimakopoulos и Mayer, 2002).

Накупине амилоида у мозгу паса експерименталне групе су биле позитивне на амилоид са антителима анти А β 1-14 и анти А β 1-42. Екстрацелуларне накупине амилоида су биле имунопозитивне код око 60% паса експерименталне групе. У испитивању је утврђено у неким случајевима присуство у оквиру плакова очувани неурони.

Експерименталну групу чинили су пси различитог расног статуса па је то вероватно разлог због ког су плакови доказани само код 60% паса а не у већем проценту. Опште је познато је да неке расе паса имају краћи животни век па би код њих требало очекивати раније развој старосних промена него код паса, чији је животни век знатно дужи. Ови налази су у складу са литературним подацима и са налазима других истраживача а указују да се код старијих живих животиња могу очекивати клинички знаци слабљења когнитивних способности (Нешић и сар., 2017; Dimakopoulos и Mayer, 2002).

Литературни подаци указују да амилоид поред тога што утиче на пропустљивост крвних судова и индиректно оштећује нервно ткиво, он може директно да делује токсично на ћелије централног нервног система. Директни утицај остварује везујући се за поједине рецепторе на мембранама ћелија или мењањем архитектура ћелијских мембрана. Такође, сматра се да амилоид генерише реактивне кисеоничке радикале у реакцији са оксидо-редуктивно активним металима. Стварање слободних радикала у ћелији покреће читав низ ланчаних реакција који на крају условљавају ћелијску смрт (Vargas и сар., 2010). Повишен ниво слободних радикала у ћелији условљава активацију одбрамбених механизма за њихово уклањање. У нашем испитивању добијени резултати указују на повишен ниво експресије металотионеина I и II у астроцитима, који учествују у одбрамбеној улози у уклањању слободних радикала у централном нервном систему. Такође, у истраживању уочена је реактивност астроцита око самих плакова, али није уочена реактивност других глија ћелија. У широј слици посматрано ово може указивати да је астроцитна реактивност последица оштећења неурона али и промена на неуронима у процесу старења. Код старијих животиња треба очекивати смањење когнитивних способности због развоја старосних промена у хипокампусу, фронталном и паријеталном режњу, на чије постојање указује и астроцитна реактивност. Такође, резултати нашег испитивања указују на интезивније промене у белој супстанци, јер је интезитет имунопозитивног сигнала на металотионеине I и II био јачи у белој него у сивој. Познато је да разградња протеина помоћу претеозома започиње везивањем убиквитина. Убиквитин је високо конзервирани протеин који поред обележавања

протеина, који ће бити протеолитички разграђени, има друге бројне физиолошке улоге у ћелији. У хуманој популацији у процесу старења убиквитин имунопозитивне грануле се јављају, али и у неким неуродегенеративни обољењима као што су Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, болест моторних неурона и др. (Uradhya и Hegde, 2007).

Протеолитички процеси у току процеса старења су интезивни јер долази до оштећења ћелија у нервном систему. Наши резултати имунохистохемијског бојења на убиквитин су у складу са литературним подацима. У истраживању смо добили позитивну имунореакцију на убиквитин код 83-87% паса експерименталне групе у хипокампусу, фронталној и паријеталној регији и код 50% паса продуженој мождини и малом мозгу, док у контролној групи нисмо имали позитивну имунореакцију. Добијени резултати нас наводе на закључак да је количина убиквитина повећана у ћелијама нервне система у значајнијој мери код старијих јединки. Имунопозитивни сигнал је био присутан и у цитоплазми ћелија али и у једрима ћелија централног нервне система паса експерименталне групе. Ово упућује на закључак да су једарни протеини били везани за убиквитин или да су активирани механизми репарације ДНК. Све ово указује у процесу старења долази до оштећења ДНК и једарних протеина чиме се нарушава функционалност једра а самим тим и ћелије. Нарушавањем функционалности ћелије настаје липофусцин, тј. непотпуном разградњом истрошених ћелијских органа на првом месту митохондрија. Многи сматрају да ПАС позитивност липофусцина потиче од нерастворљивих липидних компоненти, пошто се генерално сматра да су ПАС позитивне супстанце гликолипиди или гликопротеини (Benavides и сар., 2002). Наши резултати су у складу са литературним подацима, где смо установили да је количина накупљеног липофусцина код паса експерименталне групе варијабилна, али је најинтезивније накупљање било доказано код најстаријих паса. Такође, количина депонованог липофусцина се разликовала по сегментима, али је у продуженој мождини била највећа.

ЗАКЉУЧАК

Старењем нервни систем паса бива захваћен бројним променама свих чиниоца нервне ткива као што су неурони, глија ћелије, крвни судови и менинге. Један од битних фактора је оксидативни стрес који убрзава процес старења, при чему је мозак најостељивији орган у поређењу са осталим ткивима и органима. Сама структура и грађа нервне ткива је главни разлог овој тврдњи, јер мозак поседује висок ниво липида посебно незасићених масних киселина, висок ниво метаболизма и висок ниво реактивних микроелемената што утиче на стварање слободних радикала који би довели до пероксидације масти и оксидације протеина. Услед оксидације протеина смањује се способност неурона да одржавају нормалан пренос импулса због нарушавања синапси и интегритета цитоскелета битног за интрацелуларни транспорт. Нарушавањем хомеостазе

централног нервног система долази и до накупљања амилоида екстрацелуларно у неуропилу и зидовима крвних судова и интрацелуларно липофусцина, формирања убиквитинских гранула и глобула и др. На поремећаје у микроколини неурона реагују глија ћелије тј долази до првенствено астроглиозе и у мањем проценту астроцитозе. Све набројане промене у мозгу старих паса су разлог когнитивних дисфункција али нису у потпуности разјашњене и требало би да буде детаљније убудуће испитиване. Такође, треба нагласити да сви добијени резултати у овом испитивању указују да постоји сличност старосним променама људи али и код пацијената са неуродегенеративним обољењима као што је Алцхајмерова болест. Ово наводи на закључак да стари пси представљају веома добар анимални модел за проучавање нормалног процеса старења или неуродегенеративних обољења. Будућим истраживањима би се могло доћи до одговора у којој мери релативна старост (старост јединке у односу на животни век расе) утиче на развој промена у мозгу и какав је утицај тих промена на когнитивне способности јединки.

Захвалница:

Рад је подржан средствима Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Уговор број 451-03-66/2024-03/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Benavides S.H., Monserrat A.J., Fariña S. and Porta E.A. (2002): Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3):219-231. DOI: 10.1016/S0167-4943(01)00223-0
- Bingol B. and Schuman E.M. (2005): Synaptic protein degradation by the ubiquitin proteasome system. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5):536-541. DOI: 10.1016/j.conb.2005.08.016
- Devi L., Prabhu B.M., Galati D.F., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K. (2006): Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *Journal of Neuroscience*, 26(35):9057-9068. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2463-06.2006
- Dimakopoulos A.C. and Mayer R.J. (2002): Aspects of neurodegeneration in the canine brain. *Journal of Nutrition*, 132(6):1579S-1582S.
- Figueroa S., Oset-Gasque M.J., Arce C., Martínez-Honduvilla C.J., González M.P. (2006): Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 83(3):441-449. DOI: 10.1002/jnr.20756
-

- Fukui H., Diaz F., Garcia S., Moraes C.T. (2007): Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104(35):14163-14168. DOI: 10.1073/pnas.0701118104
- Giannini C., Kloß A., Gohlke S., Mishto M., Nicholson T.P., Sheppard P.W., Kloetzel P.M., Dahlmann B. (2013): Polyubiquitin-substrate-degradative activity of the 26S proteasome is not impaired in the aging rat brain. *PLoS ONE*, 8(5):e64042. DOI: 10.1371/journal.pone.0064042
- Gray D.A. and Woulfe J. (2005): Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005(5):re1. DOI: 10.1126/sageke.2005.5.re1
- Head E., Pop V., Sarsoza F., Kaye R., Beckett T.L., Studzinski C.M., Tomic J.L., Glabe C.G., Murphy M.P. (2010): Amyloid β -peptide and oligomers in the brain and cerebrospinal fluid of aged canines. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(2):637-646. DOI: 10.3233/JAD-2010-1397
- Head E., Pop V., Vasilevko V., Hill M., Saing T., Sarsoza F., Nistor M., Christie L.A., Milton S., Glabe C., Barrett E., Cribbs D. (2008): A two-year study with fibrillar beta-amyloid immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain Abeta. *Journal of Neuroscience*, 28(14):3555-3566. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1787-08.2008
- Jung T., Höhn A., Grune T. (2010): Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. *Methods in Molecular Biology*, 594:173-193. DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1_12
- Kumar-Singh S. (2008): Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes, Brain and Behavior*, 7(Suppl. 1):67-82. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2007.00340.x
- Nešić S., Kukolj V., Marinković D., Vučićević I., Jovanović M. (2017): Histological and immunohistochemical characteristics of cerebral amyloid angiopathy in elderly dogs, *Veterinary Quarterly*, 37(1):1-7.
- Pirici D., Van Cauwenberghe C., Van Broeckhoven C., Kumar-Singh S. (2011): Fractal analysis of amyloid plaques in Alzheimer's disease patients and mouse models. *Neurobiology of Aging*, 32(9):1579-1587. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.004
- Uchida Y. (2010): Molecular mechanisms of regeneration in Alzheimer's disease brain. *Geriatrics and Gerontology International*, 10(Suppl. 1):S158-S168. DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00612.x
- Uchida Y., Gomi F., Masumizu T., Miura Y. (2002): Growth inhibitory factor prevents neurite extension and death of cortical neurons caused by high oxygen exposure through hydroxyl radical scavenging. *Journal of Biological Chemistry*, 277:32353-32359. DOI: 10.1074/jbc.M205340200
- Upadhyaya S.C. and Hegde A.N. (2007): Role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *BMC Biochemistry*, 8(Suppl. 1):S12. DOI: 10.1186/1471-2091-8-S1-S12
-

Vargas T., Ugalde C., Spuch C., Antequera D., Morán M.J., Martín M.A., Ferrer I., Bermejo-Pareja F., Carro E. (2010): Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiology of Aging*, 31(9):1569-1581. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.09.010

.
