

DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-4-14-18



УДК 611.831-019

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© А.А. Баландин, Л.М. Железнов, И.А. Баландина, 2021

Сравнительная иммуногистохимическая характеристика глиоархитектоники таламуса человека молодого и старческого возраста

А. А. Баландин¹, Л. М. Железнов², И. А. Баландина^{1*}¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия²ФГБОУ «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, Киров, Россия

Цель исследования – установить морфологические различия таламуса человека в молодом возрасте и в старческом возрасте с помощью применения иммуногистохимического маркера – кислого фибриллярного белка (GFAP).

Материал и методы. Проведен анализ результатов секционного исследования обоих таламусов 94 умерших лиц обоего пола. В зависимости от возраста (молодого и старческого) их разделили на две группы. У умерших в анамнезе отсутствовали заболевания и травмы органов центральной и периферической нервной системы, также алкогольная и/или наркотическая зависимости, не выявлены макроскопические признаки патологии тканей мозга при взятии материала для микроскопических исследований. Дана морфологическая характеристика ткани таламуса в обеих гемисферах большого мозга с использованием окраски гематоксилином и эозином. При иммуногистохимическом исследовании образцов использовали антитела к GFAP.

Результаты. При гистологическом исследовании таламуса как в молодом, так и старческом возрасте наблюдали группы неравномерно расположенных тел нейронов с зернистой цитоплазмой и набухшими эктопированными ядрами. При постановке иммуногистохимической реакции конечный продукт реакции распределялся в телах и отростках астроцитов. В молодом возрасте встречаются единичные тела волокнистых астроцитов с умеренным количеством слабо визуализирующихся отростков. В старческом возрасте помимо статистически достоверного повышения численной плотности тел волокнистых астроцитов ($p < 0.01$) наблюдается явное увеличение количества их отростков.

Заключение. Полученные результаты позволяют получить детальное представление о морфологических характеристиках ткани таламуса мужчин и женщин в молодом и старческом возрасте. Использование антител к GFAP является чувствительным маркером возрастных изменений цитоархитектоники таламуса. Увеличение численной плотности астроцитов, а также разрастание их отростков позволяют более точно понимать процессы возрастной инволюции нервной ткани, что в дальнейшем позволит использовать эти данные в перспективных фундаментальных исследованиях.

Ключевые слова: таламус, нейроны, GFAP, астроциты, старение.

Comparative Immunohistochemical Characteristics of Thalamic Glioarchitectonics of Young and Senile Persons

© А. А. Balandin¹, L. M. Zheleznov², I. A. Balandina^{1*}, 2021¹E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia²Kirov State Medical University, Kirov, Russia

The aim of the investigation was to establish morphological differences between the human thalamus in young and senile age by using an immunohistochemical marker – glial fibrillary acidic protein (GFAP).

Material and methods. The results of the sectional study of both thalami of 94 deceased of both sexes were analyzed. Depending on their age (young and senile), they were divided into two groups. The deceased had no history of diseases and injuries of the central and peripheral nervous system organs as well as alcohol and/or drug addiction, no macroscopic signs of brain tissue pathology were detected when material was taken for microscopic examination. Morphological characterization of thalamic tissue in both hemispheres of the large brain using hematoxylin and eosin staining was given. Immunohistochemical study of the samples used antibodies to GFAP.

Results. Histological examination of the thalamus in both young and senile age revealed groups of irregularly arranged neuronal bodies with granular cytoplasm and swollen ectopic nuclei. When the immunohistochemical reaction was performed, the product of the reaction was distributed in the bodies and outgrowths of astrocytes. In young age, single bodies of fibrous astrocytes with a moderate number of poorly visualized outgrowths were found. At senile age, in addition to a statistically significant increase in the numerical density of fibrous astrocyte bodies ($p < 0.01$), there is a clear increase in the number of their outgrowths.

Conclusion. The results obtained provide a detailed insight into the morphological characteristics of the thalamic tissue of men and women at young and senile age. The use of antibodies to GFAP is a sensitive marker of age-related changes in thalamic cytoarchitectonics. The increase in the numerical density of astrocytes as well

as the outgrowth of their processes allows a more precise understanding of age-related involution of nervous tissue, which will allow to use these data in future prospective basic research.

Key words: *thalamus, neurons, GFAP, astrocytes, aging.*

***Автор для переписки:**

Баландина Ирина Анатольевна
Пермский государственный медицинский университет
им. Е.А. Вагнера, ул. Петропавловская, 26, г. Пермь,
614990, Российская Федерация

***Corresponding author:**

Irina Balandina
E.A. Wagner Perm State Medical University, ul. Petropavlovskaya, 26, Perm, 614990, Russian Federation
E-mail: balandina_ia@mail.ru

Материал и методы исследования

Работа выполнена в танатологическом отделении государственного казенного учреждения здравоохранения особого типа Пермского края «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» в период 2019–2020 годы. Она основана на анализе результатов морфологического исследования таламуса 94 умерших обоего пола и включает гистологический, морфометрический, иммуногистохимический и статистический методы исследования. Работа выполнена с разрешения локального этического комитета Пермского государственного медицинского университета имени академика. Е. А. Вагнера.

Умерших разделили на две группы с учетом их возраста. В I группу исследования вошли 24 мужчины и 23 женщины молодого возраста от 24 до 29 лет включительно, II группу составили 21 мужчина и 26 женщин старческого возраста (от 77 до 84 лет включительно). Критериями для отбора аутопсийного материала в данном исследовании, позволяющими получить более точную информацию, служили отсутствие у умерших в анамнезе заболеваний и травм органов центральной и периферической нервной системы, также алкогольной и/или наркотической зависимостей, отсутствие макроскопических признаков патологии тканей мозга при взятии материала для микроскопических исследований.

Взятие аутопсийного материала осуществляли в области заднего латерального ядра каждого таламуса. Фрагменты мозга фиксировали в 10% растворе забуференного по Лилли формалина (pH 7.2) в течение 24 ч. Материал промывали в проточной воде в течение 30 мин, а затем подвергали обезвоживанию и заливке в парафин. После заливки кусочков в парафиновые блоки на ротационном микротоме изготавливали гистологические срезы толщиной 4–6 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

При иммуногистохимическом исследовании образцов использовали концентрированные первичные моноклональные антитела к GFAP, клон Ab-6Thermo, рабочее разведение 1:100 («Lab Vision», США). При световой микроскопии экспрессию маркера регистрировали по распределению конечного продукта реакции, подвергали окрашиванию DAB+ (3,3'-диаминобензидин, «Diagnostic BioSystems», USA) в течение 1–2 мин, не допуская появления фонового окрашивания.

Морфометрический анализ исследуемых гистологических образцов проводили с использованием программного пакета BioVision, version 4,0 (Австрия). Захват

Введение

Исследование процессов старения за последние годы достигло больших успехов. Количество научных работ, посвященных данной проблеме, год от года растет ускоряющимися темпами. Доказано, что процессы старения в основном обусловлены множеством фундаментальных механизмов, которые взаимосвязаны, накладываются друг на друга и протекают одновременно [11]. Большое количество научных работ освещает проблему нормальной жизнедеятельности лиц старшей возрастной группы населения планеты – людей пожилого и старческого возраста. Травматизация при нарушении координации, нарушения полноценного функционирования когнитивной сферы, эмоциональные расстройства – все это приводит к выраженному снижению качества жизни данной когорты населения [2, 6, 9]. Главной структурой большого мозга, участвующего в обеспечении существенных функций нормальной жизнедеятельности индивидуума, является таламус. Он отвечает за интегративную роль в познании, начиная от восприятия всех видов чувствительности и завершая обучением и контролем долговременной памяти [10, 12, 14].

Центральное место в качестве прогностических маркеров прижизненных процессов стал занимать иммуногистохимический метод исследования. Данный метод отлично себя зарекомендовал в качестве «сопутствующей диагностики», а также приоткрыл окно в молекулярную биологию, позволяя более информативно понять все изменения цитоархитектоники тканей организма [8]. Для более точного понимания возрастных процессов перестройки нервной ткани используются антитела к кисломому фибриллярному белку (GFAP), так как этот белок считается классическим маркером астроглии [4, 13].

Целью данной работы явилось установление морфологических различий таламуса человека в молодом возрасте и в старческом возрасте с помощью применения иммуногистохимического маркера GFAP.

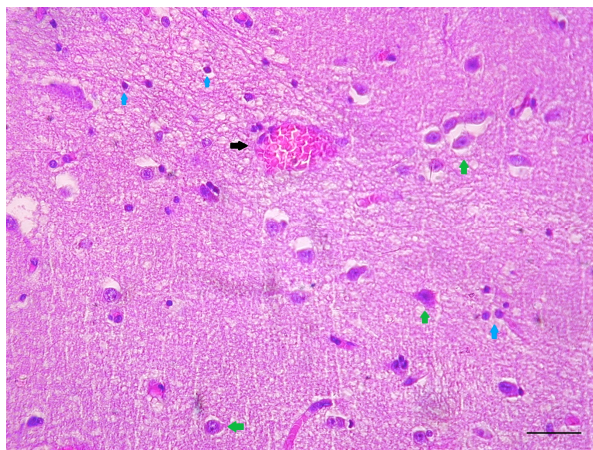


Рис. 1. Фрагмент заднего латерального ядра таламуса мужчины 24 лет. Стенки кровеносных сосудов не изменены. Отмечается полнокровие сосудов (черная стрелка). Представлены скопления нейронов (зеленая стрелка). Множественные тела олигодендроглии (голубые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40. Масштабный отрезок – 50 мкм.

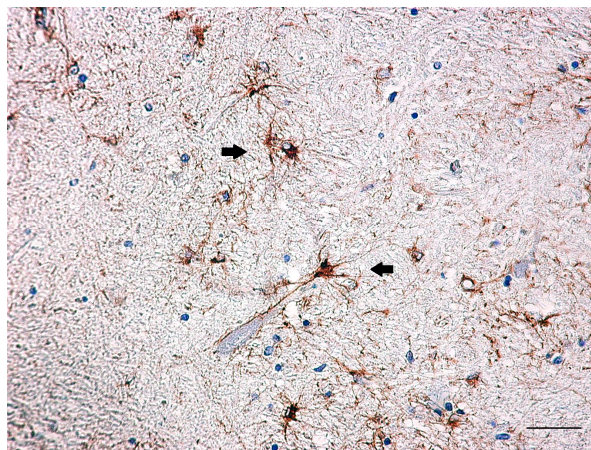


Рис. 2. Фрагмент заднего латерального ядра таламуса мужчины 23 лет: экспрессия GFAP в единичных астроцитах и их отростках (стрелки). Иммуногистохимическая реакция на GFAP. Об. 40. Масштабный отрезок – 50 мкм.

изображений обеспечивали использованием цифровой камеры для микроскопа «CAM V200», («Vision», Австрия). На цифровых изображениях с помощью программы ImageJ (версия 1.53). Оценивали общую численную плотность позитивных к GFAP астроцитов (клеток/мм²): выделяли вручную, в 50 полях зрения, разрешение объектива 40, растрового изображения – 1280×720 пикс.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием системы программного обеспечения STATISTICA V.10.0. Определяли характер распределения критерием Колмогорова–Смирнова. Вычисляли средние значения (M) и стандартное отклонение (m) для каждого случая. Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Результаты и их обсуждение

Гистологическое рутинное исследование не показало видимых морфологических различий в тканях таламуса в изучаемых возрастных периодах. Как в молодом, так и старческом возрасте наблюдали группы неравномерно расположенных тел нейронов с зернистой цитоплазмой и набухшими эктопированными ядрами, периваскулярным отеком. Отростки нейронов и астроцитов плохо различимы. Наблюдали группы олигодендроцитов, образующие небольшие комплексы (рис. 1).

При постановке иммуногистохимической реакции конечный продукт реакции распределялся в телах и отростках астроцитов. В молодом возрасте встречались единичные тела астроцитов с умеренным количеством

слабо визуализирующихся отростков (рис. 2). В старческом возрасте помимо статистически достоверного возрастания численной плотности тел фиброзных астроцитов наблюдалось явное увеличение количества их отростков (рис. 3).

При использовании иммуногистохимического метода у лиц старческого возраста в ткани таламуса выявлено разрастание астроглии. Так, у мужчин старческого возраста установлено статистически достоверное увеличение численной плотности GFAP-позитивной астроглии в таламусах правой и левой гемисфер ($p < 0.01$). У женщин ее численная плотность также увеличивалась как в таламусе правой, так и левой гемисфер ($p < 0.01$). При сравнении численной плотности GFAP-позитивных астроцитов между таламусами разных гемисфер статистически достоверного различия показателей не выявлено ($p > 0.05$). Также не было установлено статистически достоверных различий при сравнении значений ее численной плотности в таламусе мужчин и таламусе женщин в пределах одного возрастного периода ($p > 0.05$) (табл. 1).

Мнения различных исследователей относительно функции астроглии сходятся. Считается, что эти клетки являются не только «помощниками нейронов», а полноправными участниками всех процессов, протекающих в тканях мозга, полноценными регуляторами работы нервной ткани в целом [1, 5].

Как отмечалось в ранее опубликованных работах, астроглия играет основополагающую роль в поддержании качественного функционирования гематоэнцефалического барьера, что является ключевым фактором в сохранении гомеостаза ткани головного мозга [7]. В нашем исследовании мы также

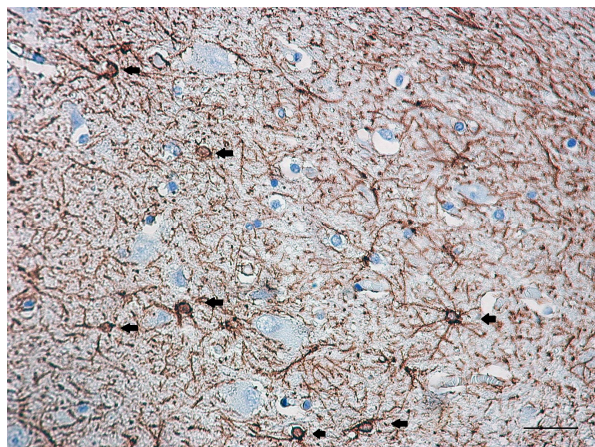


Рис. 3. Фрагмент заднего латерального ядра таламуса мужчины 79 лет: множество астроцитов и их отростков с высокой плотностью GFAP (стрелки). Иммуногистохимическая реакция на GFAP. Об. 40. Масштабный отрезок – 50 мкм.

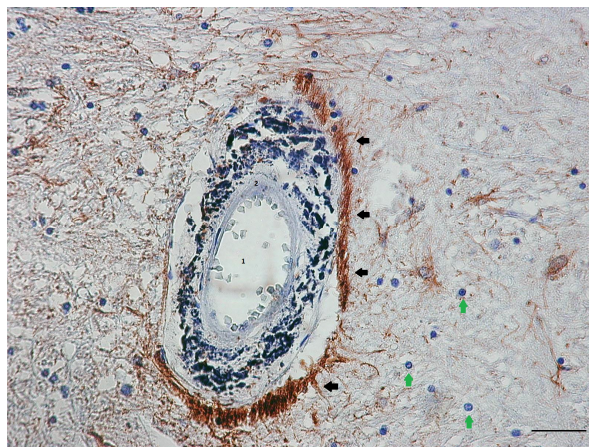


Рис. 4. Периваскулярные GFAP-позитивные структуры в заднем латеральном ядре таламуса. Обозначения: 1 – просвет сосуда, 2 – стенка сосуда; скопление концевых ножек астроцитов, окружающий нейропил (черные стрелки). Иммуногистохимическая реакция на GFAP Об. 40. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Таблица 1

Численная плотность GFAP позитивных астроцитов в заднем латеральном ядре таламуса у мужчин и у женщин (клеток/мм²)

у мужчин и у женщин (клеток/мм ³)			
Таламус	Возрастные группы		t (p)
	Молодой возраст	Старческий возраст	
Мужчины (n=45)			
Правый	670±8.1	830±9.3	t=12.97, p<0.01*
Левый	680±6.7	810±9.7	t=11.03, p<0.01*
Женщины (n=49)			
Правый	675±9.7	800±12.9	t=7.74, p<0.01*
Левый	690±10.8	810±5.4	t=9.94, p<0.01*

Примечание: * – различия между возрастными группами статистически значимы при p<0.01 (t-критерий Стьюдента для парного сравнения независимых выборок).

визуализировали большие скопления GFAP-позитивных астроцитов возле капилляров в ткани таламуса (рис. 4).

Астроциты участвуют во всех патологических процессах, протекающих в ткани мозга. Их активное разрастание и трансформация называется «реактивным астроглиозом» [3, 5]. Исследования, проведенные в этой области в последние десятилетия, дают доказательства того, что реактивный астроглиоз – не только «тотальная перестройка цитоархитектоники» нервной ткани, но и многообразие тонко настраиваемых морфофункциональных процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях, диапазон которых варьирует от незначительных изменений в экспрессии белков-маркеров до образования «нервотканых рубцов» [5].

Полученная картина позволяет более четко понять процессы возрастных иволютивных изменений в нервной ткани человека, а также объяснить клинические проявления старения, такие как ухудшение когнитивной

сферы, нарушения координации, снижение скорости реакций на стимулы из внешней среды.

Заключение

Результаты исследования позволили получить новые данные о морфофункциональной организации заднего латерального ядра таламуса мужчин и женщин в молодом и старческом возрасте. Стандартная иммуногистохимическая реакция на GFAP является чувствительным маркером изменений глиоархитектоники таламуса. Установлено, что процессы возрастной инволюции нервной ткани таламуса у человека сопровождаются увеличением численной плотности астроцитов и разрастанием их отростков. Это позволяет более точно понимать роль возрастного астроглиоза в реорганизации нейроглиальных взаимоотношений и, в дальнейшем, использовать эти данные в перспективных фундаментальных исследованиях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Гомазков О.А. Астроциты как посредники интеграционных процессов в мозге. Успехи современной биологии. 2018;138(4):373–82 [Gomazkov OA. Astrocytes as mediators of integration processes in the brain. Uspekhi Sovremennoi Biologii. 2018;138(4):373–82] (in Russian). doi: 10.7868/S004213241804004X
2. Гудков А.Б., Демин А.В. Особенности постурального баланса у мужчин пожилого и старческого возраста с синдромом страха падения. Успехи геронтологии. 2012;25(1): 166–70 [Gudkov AB, Dyomin AV. Features of postural balance in elderly and senile men with fear of falling syndrome. Advances in gerontology. 2012;25(1):166–70] (in Russian)
3. Наумов Н.Г., Дробленков А.В. Реактивные изменения астроцитов прилежащего ядра головного мозга после ограничения кровотока в эксперименте. Медицинский академический журнал. 2016;16(4):75–6 [Naumov NG, Droblenkov AV. Reactive changes in astrocytes of the nucleus accumbens of the brain after blood flow restriction in the experiment. Medical Academic Journal. 2016;16(4):75–6] (in Russian).
4. Румянцев Т.А., Пожилов Д.А., Варенцов В.Е., Москаленко А.В. Возрастные особенности экспрессии GFAP и DCX в обонятельных луковицах и ростральном миграционном потоке у крыс. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018.7(2):69–75 [Rumyantseva TA, Pozhilov DA, Varentsov VE, Moskalenko AV. Age-Related Features of GFAP and DCX Expression in Rats' Olfactory Bulbs and Rostral Migratory Stream. Journal of Anatomy and Histopathology. 2018 Jul 3;7(2):69–75] (in Russian). doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-69-75
5. Liu B, Teschemacher AG, Kasparov S. Neuroprotective potential of astroglia. Journal of Neuroscience Research. 2017 Aug 24;95(11):2126–39. doi: 10.1002/jnr.24140
6. Zhao B, Shang S, Li P, Chen C, Dang L, Jiang Y, et al. The gender- and age- dependent relationships between serum lipids and cognitive impairment: a cross-sectional study in a rural area of Xi'an, China. Lipids in Health and Disease. 2019 Jan 5;18(1). doi: 10.1186/s12944-018-0956-5
7. Chow BW, Gu C. The Molecular Constituents of the Blood–Brain Barrier. Trends in Neurosciences. 2015 Oct;38(10):598–608. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.003
8. Torlakovic EE, Nielsen S, Vyberg M, Taylor CR. Getting controls under control: the time is now for immunohistochemistry. Journal of Clinical Pathology. 2015 Nov 1;68(11):879–82. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202705
9. Gazibara T, Kurtagic I, Kisc-Tepavcevic D, Nurkovic S, Kovacevic N, Gazibara T, et al. Falls, risk factors and fear of falling among persons older than 65 years of age. Psychogeriatrics. 2017 Jan 27;17(4):215–23. doi: 10.1111/psyg.12217
10. Gent TC, Bassetti CL, Adamantidis AR. Sleep-wake control and the thalamus. Current Opinion in Neurobiology. 2018 Oct;52:188–97. doi: 10.1016/j.conb.2018.08.002
11. Farr JN, Almeida M. The Spectrum of Fundamental Basic Science Discoveries Contributing to Organismal Aging. Journal of Bone and Mineral Research. 2018 Aug 13;33(9):1568–84. doi: 10.1002/jbmr.3564
12. Wolff M, Vann SD. The Cognitive Thalamus as a Gateway to Mental Representations. The Journal of Neuroscience. 2018 Nov 2;39(1):3–14. doi: 10.1523/jneurosci.0479-18.2018
13. Tykhomyrov AA, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): on the 45th Anniversary of Its Discovery. Neurophysiology. 2016 Feb;48(1):54–71. doi: 10.1007/s11062-016-9568-8
14. Wijesinghe R, Protti DA, Camp AJ. Vestibular Interactions in the Thalamus. Frontiers in Neural Circuits. 2015 Dec 2;9. doi: 10.3389/fncir.2015.00079

Поступила в редакцию 13.09.2021

Принята в печать 24.11.2021

Received 13.09.2021

Accepted 24.11.2021

Для цитирования: Баландин А.А., Железнов Л.М., Баландина И.А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика глиоархитектоники таламуса человека молодого и старческого возраста. Журнал анатомии и гистопатологии. 2021; 10(4): 14–18. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-4-14-18

For citation: Balandin A.A., Zheleznov L.M., Balandina I.A. Comparative Immunohistochemical Characteristics of Thalamic Glioarhitectonics of Young and Senile Persons. Journal of Anatomy and Histopathology. 2021; 10(4): 14–18. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-4-14-18