

MORFOMETRIJSKE I POJEDINE HISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE CORPORA AMYLACEA HUMANOG ENTORINALNOG POLJA TOKOM PROCESA STARENJA

Ivan Jovanovi}, Natalija Stefanovi}*, Sladana Ugrenovi}*,
Svetlana Anti}*, Rade ^ukuranovi}*, Vesna Stojanovi}*,
Jovan Stojanovi}**, Goran Ili}**, Radovan Karad'i}**,
Lidija Kosti}**, Miodrag Zdravkovi}** i Sandra Antovi}***

Corpora amylacea su kalcifikovane strukture koje su prisutnije u mozgu zdravih starih osoba, kao i osoba koje boluju od nekih neurodegenerativnih bolesti. Kao materijal je korišćeno tkivo entorinalnog polja 30 kadavera, starosti od 20 do 82 godine koji su klasifikovani u tri starosne grupe: I (20±44.g.), II (45±69.g.) i III (70.g. i stariji). Tkivo je uzimano tokom rutinskih autopsija izvedenih u Institutu za sudsku medicinu u Nišu. Ono je, zatim, obrađeno standardnom histološkom procedurom, nakon čega su pravljene presece debljine 10 µm koji su bojeni HE, PAS i AB PAS metodom, kao i trihromnim bojenjem za vezivno tkivo ± modifikacija po Mallory-u. Corpora amylacea su PAS i AB PAS pozitivne strukture. Na preparatima bojenim HE, boje se plavi-asto, a na preparatima bojenim trihromnim bojenjem ± modifikacija po Mallory-u, svetlo zeleno. Lokalizovana su pretežno subpijalno, u molekularnom sloju kore, i u subkortikalnoj beloj masi, naročito u okolini krvnih sudova. U delu kore ispod molekularnog sloja gde se nalaze granularne i piramidalne ćelije corpora amylacea nisu detektovana. Ona su pravilno okruglog ili ovalnog oblika. Tokom procesa starenja dolazi do porasta njihovog prisustva u EP (to je prvenstveno porastom njihove veličine bez značajnije promene njihovog oblika. To potvrđuje i signifikantan porast prosečnog areala i dijametra corpora amylacea koji je detektovan astereološkom analizom. U III starosnoj grupi dolazi do formiranja konglomerata u subpijalnom području i oko krvnih sudova u subkortikalnoj beloj masi. Njihovini veliki broj corpora amylacea koja se međusobno dodiruju ali njihova fuzija nije detektovana. *Acta Medica Medianae; 2004;43(3): 17-22.*

Ključne reči: entorinalno polje, corpora amylacea, starenje, morfometrijska analiza

Institut za anatomiju Medicinskog fakulteta u Nišu *
Institut za sudsku medicinu u Nišu **

Kontakt: Ivan Jovanovi}
Institut za anatomiju Medicinskog fakulteta
Bulevar Dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš
Srbija i Crna Gora
Tel.: +381-64-307-45-40, e-mail: ivanjov@junis.ni.ac.yu

Uvod

Entorinalno polje (EP) nalazi se u sredini unutrašnjeg temporalnog regiona, od 2,5 do 3,0 cm iznad gyrus ambiens-a, u rostralnom delu parahipokampalne vijuge. Na osnovu cito- i mijeloarhitektonske građe, kao i laminarne strukture EP, označeno je kao periarhikorteks. To je deo neokorteksa koji se nalazi neposredno oko arhikorteksa i njegova struktura predstavlja po složenosti prelazni tip kore između arhikorteksa i izokorteksa (1). Jedna od najupevrednijih odlika EP je prisustvo ostrvaca velikih multipolarnih ćelija u II sloju kore. Druga bitna odlika je izdvajanje površnog dela sloja III u poseban IIIs podsloj koji je celularan u rostralnim, a u kaudalnijim

biva sve siromašniji ćelijama, a bogatiji vlaknima. Za razliku od sloja III klasičnog neokorteksa, sloj IIIs EP sadrži multipolarne, kao i atipične piramidalne ćelije, koje su grozdasto grupisane. Sledeća karakteristika EP je da se umesto unutrašnjeg zrnastog sloja, nalazi acelularni i vlaknima bogat sloj, označen kao lamina dissecans (sloj IV). Svaka od ovih karakteristika ispoljena je u različitim stepenu u različitim delovima EP, (to predstavlja osnovu njegove podele na više manjih delova (2). EP i hipokampus predstavljaju delove mozga u kojima su starosne promene koje su prisutne i u drugim delovima mozga najzastupljenije (3). Neki autori smatraju da upravo ove promene EP dovode do oštećenja perforantnog snopa i da su odgovorne za kognitivne promene koje se javljaju kod zdravih starih osoba (4).

Corpora amylacea (CA), Lafora, „Lafora-like”, Bielchowsky ili polisaharidna tela (prvi je detektovao Purkinje (1837), a opisao Virchow (1851). To su mikroskopske strukture koje se javljaju normalno tokom starenja i to ne samo u centralnom nervnom sistemu, već i u drugim organima (srcu, tiroidnoj žlezdi, prostati, jetri, plućima i skeletnoj muskulaturi). Odnedavno je zapažen porast njihovog

broja i kod nekih neurodegenerativnih poreme}aja, kao {to su Alzheimer-ova demencija, multipla skleroza, Pick-ova bolest, zatim nekih uro|jenih i ste-enih poreme}aja metabolizma ugljenih hidrata, epilepsije itd. (5). Njihov ta-an sastav nije potpuno poznat. U poslednje vreme primenom imunohisto-hemijskih metoda i mikroanalize X ‡ zracima potvr|eno je prisustvo neuronalnih, pojedinih glijalnih komponenti (astrocitarne i oligodendrocitarne), mitohondrijalnih proteina i DNA i nekih minerala (6,7,8,9). Ipak i pored svega prethodno navedenog njihovo poreklo, mehanizam formiranja i zna-aj jo{ uvek ostaju nerazja{njeni.

Cilj istra`ivanja

Cilj istra`ivanja bio je da se histolo{kom analizom primenom konvencionalne svetlosne mikroskopije sagledaju morfologija, lokalizacija i distribucija corpora amylacea u entorinalnom polju kore velikog mozga -oveka. Morfometrijskom analizom, primenom astereolo{ke metode, izvr{ena je kvantifikacija prisustva, kao i pojedinih karakteristika CA u humanom entorinalnom polju tokom procesa starenja.

Materijal i metode

Tokom istra`ivanja, kao materijal, kori}eno je mo`dano tkivo 30 kadavera, dobijeno sa rutinskih autopsija u Institutu za sudsku medicinu u Ni{u. Kadaveri su starosti od 20 do 82 godine i klasifikovani su u tri starosne grupe: I (20‡44.g.), sa prose-nom staro{u kadavera ove grupe od 37,75 godina, II (45‡69.g.), sa prose-nom staro{u kadavera od 55,67 godina i III (70.g. i stariji), sa prose-nom staro{u kadavera od 77,40 godina. Vremenski period od trenutka smrti do uzimanja materijala nije bio du`i od 24 -asa. Uzrok smrti kadavera je prete`no bio akcident bez verifikovanih o{te}enja CNS-a. Kadaveri nisu imali za `ivota dijagnostifikovano oboljenje nervnog sistema. Na donjoj strani hemisfere, u predelu unkusa parahipokampalne vijuge uziman je uzorak tkiva veli-ine 10 x 10 mm koji je obuhvatao EP. Tkivo je, zatim, fiksirano u 10% neutralnom formalinu tokom 24 -asa. Kalupljenje je vr{eno u paraplustu, nakon -ega su pravljene presece debljine 10 µm. Oni su bojeni HE, PAS, AB PAS , i trihromnom metodom za vezivno tkivo ‡ modifikacija po Mallory ‡ u (10) i zatim analizirani pod svetlosnim mikroskopom sa projekcionim ekranom „Reichert Visopan“.

Nakon histolo{ke analize preparata izvr{ena je morfometrijska analiza 100 slu-ajno odabranih CA svake starosne grupe uz pomo} dvostrukog mre`nog sistema B_{100} , koji je stavljan preko projekcionog ekrana mikroskopa Reichert Visopan. Za analizu su kori}ene i debele i tanke, linije testnog sistema, kao i ta-ke koje se nalaze na njihovom preseku ($P_t=400$). Du`ina odstojanja izme|u dve testne ta-ke (d) na uve}anju 400 x iznosi 25 µm i dobijena je kalibriranjem testnog sistema uz pomo} objektnog mikrometra (1:100). Odstojanje izme|u dve testne linije (H) iznosi $d/2 = 12,5$ µm. Povr{ina testnog sistema

(A_t) iznosi $62,5 \times 10^3 \mu m^2$ ($A_t = P_t \times d^2$), a povr{ina testnog sistema koja pripada jednoj ta-ki (a) iznosi $156,25 \mu m^2$ ($a = \frac{A_t}{400}$). Za ispitivanje morfometrijskih karakteristika CA primenjena je astereolo{ka metoda za dvodimenzionalne strukture, pri -emu su odre|ivani prose-an areal ($\overline{A_{CA}}$) i prose-an dijametar ($2R_{CA}$) za CA svake starosne grupe prema formulama Kali{nika (11). Areal je izra-unavan prema formuli $A_{CA} = P_{CA} \times a$ (P_{CA} predstavlja broj ta-aka testnog sistema koje padaju na profile CA). Prose-an areal je izra-unavan tako {to je najpre izra-unavan prose-an areal CA za svaki slu-aj u starosnoj grupi, a zatim je iz tih vrednosti izra-unavana prose-na vrednost za svaku starosnu grupu. Formula za prose-an dijametar CA je izvo|ena iz formule za izra-unavanje povr{ine kruga ($2R_{CA} = 2 \times \sqrt{\frac{A_{CA}}{\pi}}$). Svi dobijeni parametri su statisti-ki analizirani. Prva starosna grupa je predstavljala kontrolnu grupu. Izra-unavana je standardna devijacija (SD) i standardna gre{ka (SE) za svaku starosnu grupu, a signifikantnost razlike je proveravana uz pomo} t-testa za mali nezavisni uzorak (12).

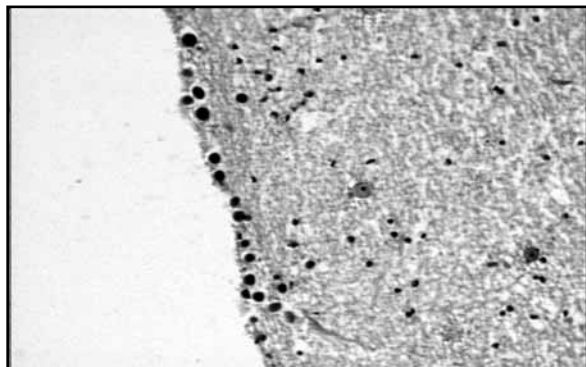
Karakteristi-ne forme CA su dodatno analizirane uz pomo} digitalnog imaging sistema „Olympus BX 50“, {to je zatim verifikovano fotografijama.

Rezultati

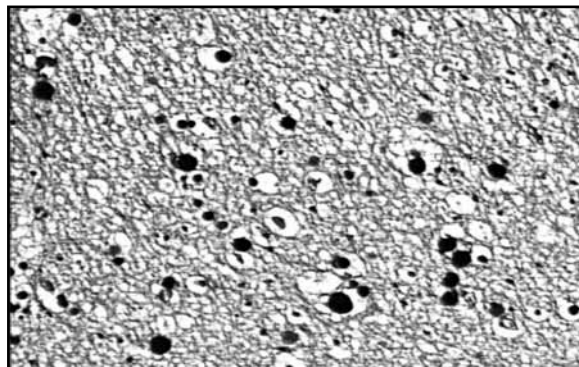
Morfolo{ke karakteristike

CA imaju pravilan okrugao ili ovalan oblik. Karakteristi-ne su plavi-aste boje na preparatima bojenim HE (Slika 1). To su PAS i AB PAS pozitivne strukture (Slike 2 i 3). Na preparatima bojenim trihromnim bojenjem za vezivno tkivo ‡ modifikacija po Mallory-u boje se blede zeleno (Slika 4). U I starosnoj grupi CA su sitna. Obi-no su lokalizovana subprijalno neposredno ispod leptomeningi, u vidu jednog sloja, ili su bez nekog reda razbacana u molekularnom sloju sive mase. Njihovo prisustvo u slojevima kore ispod molekularnog, gde nalaze granularne i piramidalne }elije, nije uo-eno. Pojedina-na tela{ca su detektovana u subkortikalnoj beloj masi, gde su prete`no raspore|ena bez nekog pravila, pri -emu su neka lokalizovana u neposrednoj okolini krvnih sudova.

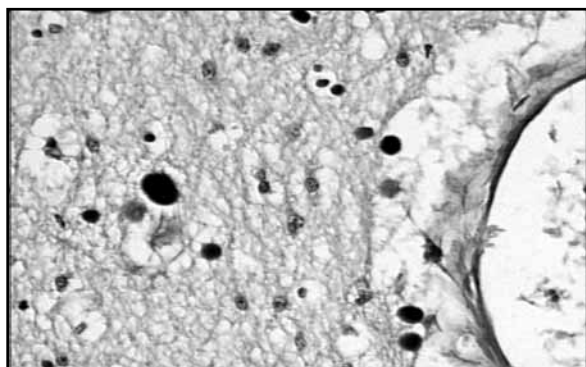
U II i III starosnoj grupi detektovano je pove}ano prisustvo CA. Ona postaju brojnija i ve}a pri -emu ne dolazi do zna-ajnije promene njihovog oblika. Dolazi do grupisanja manjeg ili ve}eg broja tela{aca u konglomerate koji su prete`no lokalizovani subprijalno i u subkortikalnoj beloj masi. Subprijalno ove formacije se uo-avaju neposredno ispod leptomeningi, u vidu vi{e slojeva CA, i pri tome zahvataju i dublje delove molekularnog sloja kore (Slika 5). U subkortikalnoj beloj masi CA su grupisane oko krvnih sudova. U III starosnoj grupi detektovani su konglomerati u okolini krvnih sudova subkortikalne bele mase. Oni se sastoje iz velikog broja CA, koja su gusto zbijena, a neka od njih se me|usobno i dodiruju (Slika 6). Me|utim, njihovo me|usobno stapanje nije uo-eno.



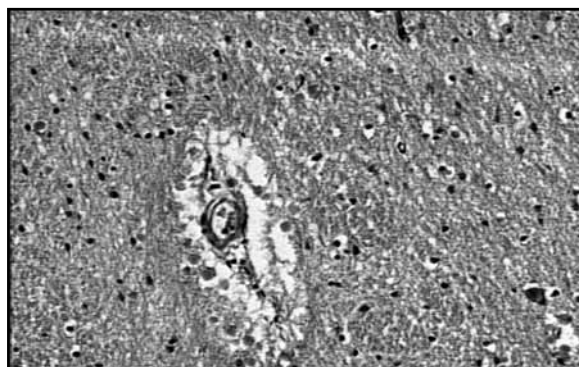
Slika 1. CA entorinalnog polja, lokalizovani subpjalno; HE (objektiv 20x, okular 10x)



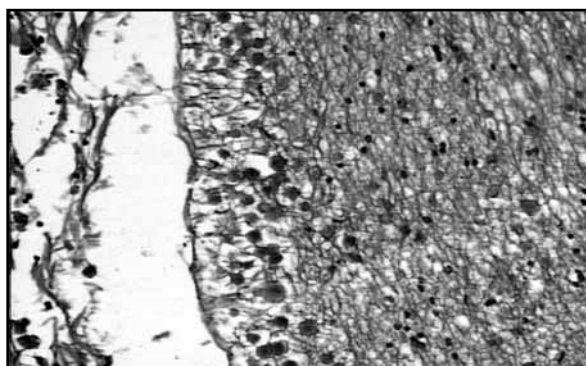
Slika 2. CA u beloј masi entorinalnog polja; PAS (objektiv 40x, okular 10x)



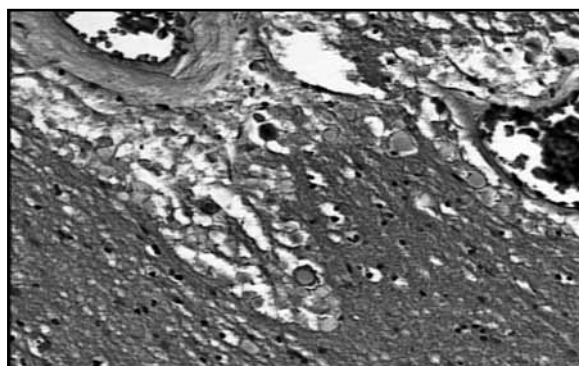
Slika 3. Entorinalno polje; AB PAS (objektiv 40x, okular 10x)



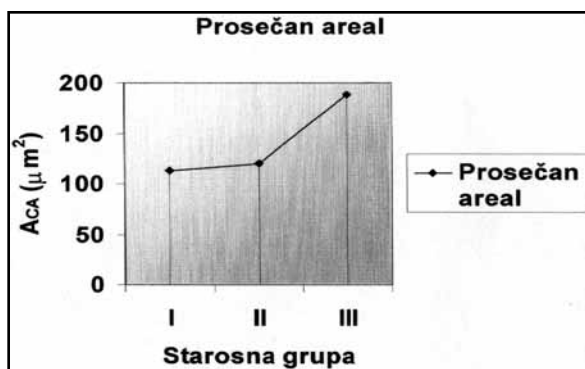
Slika 4. CA bele mase entorinalnog polja; trihromno bojenje \ddagger modifikacija po Mallory-u (objektiv 20x, okular 10x)



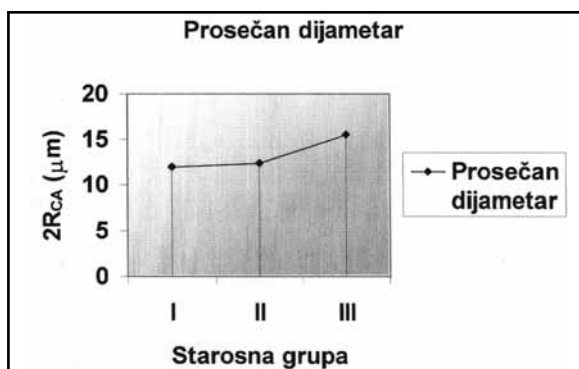
Slika 5. CA III starosne grupe u entorinalnom polju, lokalizovana subpjalno HE (objektiv 20x, okular 10x)



Slika 6. Konglomerat CA u okolini krvnog suda subkortikalne bele mase entorinalnog polja; HE (objektiv 20x, okular 10x)



Slika 7. Prosečan areal CA entorinalnog polja tokom starenja ~oveka



Slika 8. Prosečan dijametar Ca entorinalnog polja tokom starenja ~oveka

Morfometrijske karakteristike

CA su detektovana u EP u 5 od 8 slu-ajeve (62,5%) u I starosnoj grupi, u 10 od 12 slu-ajeve (82,3%) u II starosnoj grupi i u svih 10 slu-ajeve (100%) III starosne grupe.

Morfometrijskom analizom detektovan je porast svih astereolo{kih parametara CA tokom procesa starenja. Prose-an areal CA humanog EP iznosio je u I starosnoj grupi $112,95 \pm 43,33 \mu\text{m}^2$. U II starosnoj grupi njegova vrednost raste u odnosu na I starosnu grupu za 6,52% i iznosi $120,32 \pm 37,28 \mu\text{m}^2$, {to me|utim ne predstavlja signifikantan porast. Vrednost prose-nog areala CA III starosne grupe raste u odnosu na II starosnu grupu za 56,72% i iznosi $188,57 \pm 42,60 \mu\text{m}^2$, {to predstavlja signifikantan porast ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) u odnosu na I starosnu grupu (Slika 7). Prose-an dijametar CA iznosi u I starosnoj grupi $11,99 \pm 2,36 \mu\text{m}$. Njegova vrednost u II starosnoj grupi raste za 3,25% i iznosi $12,38 \pm 2,02 \mu\text{m}$, {to ne predstavlja signifikantan porast u odnosu na I starosnu grupu. Prose-an dijametar CA III starosne grupe pokazuje signifikantan porast u odnosu na I starosnu grupu ($p < 0,05$ i $p < 0,01$). Njegova vrednost raste za 22,41% u odnosu na vrednost prose-nog dijametra CA II starosne grupe i iznosi $15,49 \pm 1,74 \mu\text{m}$ (Slika 8).

Diskusija

CA su strukture za koje se do sada smatralo da se normalno javljaju u mozgu tokom starenja ~oveka. Veliki broj ultrastrukturnih istra`ivanja, koja su sprovedena do danas, izvr{ena su uglavnom na kadaveri-nom materijalu, kod koga dolazi do znatnog postmortalnog naru{avanja strukture mozga, te se njihovo poreklo ne mo`e sa sigurno{}u vezati za odre|enu vrstu }elija (8, 13). Iako njihova uloga nije u potpunosti rasvetljena sve do danas, ve}ina istra`iva-a smatra da ona imaju korisnu ulogu u CNS-u. CA se kod starijih osoba mogu na}i prakti-no u svim delovima nervnog sistema. Ipak, ona su prisutnija u nekim predilekcionim podru-jima. Tokom na{eg istra`ivanja detektovali smo da su prete`no lokalizovana subprijalno i u subkortikalnoj beloj masi EP, pri ~emu tokom starenja dolazi do njihovog nagomilavanja u ovim podru-jima i formiranja konglomerata. Cavanagh (5) navodi da se ovi konglomerati CA mogu kod zdravih starih osoba detektovati naj-e{}e subependimalno, u krovu, a ne{to re|e i u podu tre}e i ~etvrte mo`dane komore, kao i u krovu Silvy-jevog kanala. Na spolja{njoj povr{ini velikog mozga ona su lokalizovana subprijalno. Naj-e{}e su detektovana u bazalnom delu, zatim, na unutra{njoj strani temporalnog re`nja, kao i iznad hipokampalne formacije velikog mozga. U sub-kortikalnoj beloj masi CA su naj-e{}e lokalizovana oko krvnih sudova srednjeg i ve}eg kalibra u Virchow-Robin-ovim prostorima, {to smo i mi detektovali tokom na{eg istra`ivanja. Histolo{kom analizom nismo detektovali CA u delovima kore ispod molekularnog sloja, gde su lokalizovane velike piramidalne i granularne }elije. Busard i sar. (14) su

detektovali CA u frontalnoj i temporalnoj sivoj masi, dok Cavanagh (5) navodi jo{ da su takva CA lokalizovana prete`no intraksonalno, i imaju veoma mali dijametar (do $2 \mu\text{m}$), te da se mogu detektovati jo{ i u sivoj masi ki-mene mo`dine i u perifernim nervima.

CA imaju pravilan okrugao ili ovalan oblik, dok neka mogu da budu i elongirana. Mi, tokom na{eg istra`ivanja, nismo detektovali samo elongirane forme CA. Primenom HE metode detektovali smo da se boje plavi-asto, najverovatnije zbog prisustva kalcijuma u njihovoj gra|i. PAS i AB PAS pozitivna reakcija ukazuje na prisustvo glikoproteina, proteoglikana, mukopolisaharida, {to je saglasno sa rezultatima istra`ivanja Sakai i sar. (15), Peinado, (16) i Hoyaux i sar. (7). Na preparatima bojenim trihromnim bojenjem modifikacija po Mallory-u, boje se zeleno {to ukazuje na prisustvo supstanci koje u-estvuju u izgradnji vezivnog tkiva. Singhrao i sar. (8) su, mikroanalizom X{ zracima, otkrili prisustvo Ca, {to obja{njava njihovu plavu prebojenost koju smo mi tokom na{eg istra`ivanja detektovali na preparatima bojenim HE, zatim Fe i Cu. Tokutake i sar. (17) su kasnije otkrili jo{ i prisustvo Na, P, S i Cl-. Ove histohemijske, kao i neke druge karakteristike CA, omogu}avaju da se na-ini razlika izme|u njih i sli-nih struktura, kao {to su mikroskopska globularna tela{ca (18), PP-1 pozitivnih sferi-nih inkluzija aksonalnih sferoida (19). Cavanagh (5) navodi da se njihov dijametar kre}e od 2 do $20 \mu\text{m}$, {to odgovara dijametru koji smo i mi detektovali tokom na{eg istra`ivanja i koji se kre}e od $11 \pm 16 \mu\text{m}$.

Ve}ina autora (20,21,16,5) navodi da su CA znatno prisutnija u centralnom nervnom sistemu zdravih starih osoba. Cavanagh (5) tvrdi da njihov broj po-inje naglo da se pove}ava u periodu izme|u 30. i 40. godine `ivota. Me|utim, veoma je malo sistema-tski sprovedenih istra`ivanja na polju kvantifikacije CA, koja bi mogla da podr`e ovaj op{ti stav. Porast prose-nog areala detektovan morfometrijskom analizom, u na{em slu-aju, signifikantan je u III starosnoj grupi, i govori u prilog pove}anog prisustva CA u EP zdravih starih osoba. Taj porast je jednim delom verovatno posledica porasta njihovog broja, koji su detektovali i Busard i sar. (14). Signifikantan porast prose-nog dijametra koji smo detektovali tokom na{eg istra`ivanja u III starosnoj grupi potvr|uje porast njihove veli-ine tokom starenja, {to navodi i Cavanagh (5). Ove promene, dalje tokom starenja, prati i formiranje konglomerata kako u subprijalnom podru-ju, tako i u dubljim delovima molekularnog sloja kore. U subkortikalnoj beloj masi ovakvi konglomerati su detektovani u okolini krvnih sudova. Izme|u pojedinih CA u takvim formacijama postoji blizak kontakt ali njihovu fuziju, koju spominje Cavanagh (5), tokom na{eg istra`ivanja nismo detektovali. Njihovo potencijalno me|usobno spajanje je verovatno jedan od mogu}ih uzroka pove}anja njihove veli-ine tokom starenja.

Sbarbati i sar. (22), ovakve starosne promene i lokalizaciju CA, obja{njavaju njihovim kretanjem, sa mesta formiranja u prethodno navedene predileksione regije mozga, {to je izazvano pokretima i pulzacijama okolnog normalnog tkiva. Ultrastrukturnim istra-

ivanjima, izvršenim do sada, utvrđeno je da CA imaju jezgro filamentozne građe (16, 7). Singhrao i sar. (8) su oko jezgra uočili omotač za koji su imunohistohemijskom analizom utvrdili da je astrocitnog porekla. Hemijskom analizom (5) utvrđeno je da CA čine heksoze (87,9%) i proteini (4,7%). Imunohistohemijskim putem u proteinskom delu detektovane su komponente neurona, oligodendrocita i astrocita (8, 9, 23). Smatra se da CA nastaju u perikarionu neurona i u oligodendrocitima. Aksonima ona bivaju transportovana do astrocita koji ih preuzimaju i transportuju do subpinalnog i subependimalnog područja. Ona nastaju najverovatnije tako što na njihovo polisaharidno jezgro se talože produkti oksidativnog oštećenja neurona, oligodendrocita, mitohondrija i drugih materija koje astrociti prikupljaju iz ekstracelularnog prostora. Na taj način CA vrše sekvestraciju tetnih materija i zatim preko nastavaka astrocita bivaju transportovana do subpinalnog, subependimalnog i subarahnoidalnog područja gde se nagomilavaju (5). Tokutake i sar. (17) navode kao mogućnost da CA mogu da nastanu kao rezultat poremećaja krvno tkivo ili krvno tkivo likvorne barijere, kada ona predstavljaju mesta gde se vrši adsorpcija neorgan-

skog i drugog materijala koji je napustio krvne sudove. Ovakvu njihovu ulogu potvrđuje i porast njihovog broja tokom neurodegenerativnih poremećaja, kod kojih dolazi do povećanog stvaranja slobodnih radikala i posledičnog oštećenja nervnog tkiva. Ipak, eksperimentalna potvrda ovih pretpostavki ne postoji za sada, tako da dalja istraživanja treba da daju konačan odgovor o pravom značenju CA za centralni nervni sistem.

Zaključak

Corpora amylacea su kalcifikovane strukture prisutnije u entorinalnom polju zdravih starijih osoba. Ona imaju pravilan okrugao ili ovalan oblik i lokalizovana su pretežno subpinalno i u subkortikalnom delu bele mase. Tokom starenja dolazi do porasta njihove veličine bez značajnije promene njihovog oblika. Uočava se i njihova veća grupisanost oko krvnih sudova, naročito u subkortikalnoj beloj masi, pri čemu tada grade konglomerate u kojima su međusobno u bliskom kontaktu, ali ipak ne dolazi do njihovog međusobnog stapanja.

Literatura

- Kahle W, Frotscher M. Color Atlas of Human Anatomy, Vol 3. Nervous System and Sensory Organs. 5th revised ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2002.
- Krimer LS, Hyde TM, Herman MM, Saunders RC. The Entorhinal Cortex: an Examination of Cyto- and Myeloarchitectonic Organization in Humans. *Cereb Cortex* 1997; 7: 722-31.
- Garcia-Sierra F, Hauw JJ, Duyckaerts C, Wischik CM, Luna-Munoz J, Mena R. The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old. *Acta Neuropathol* 2000; 100: 29-35.
- Kirkby DL, Higgins GA. Characterization of perforant path lesions in rodent models of memory and attention. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 823-38.
- Cavanagh JB. Corpora amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 265-95.
- Hevner RF, Wong-Riley MTT. Entorhinal cortex of the human, monkey and rat: metabolic rate revealed by cytochrome oxidase. *J Comp Neurol* 1992; 264: 356-95.
- Hoyaux D, Decaestecker C, Heizmann CW, Vogl T, Schafer BW, Salmon I, et al. S100 proteins in Corpora amylacea from normal human brain. *Brain Res* 2000; 867: 280-8.
- Singhrao SK, Neal JW, Newman GR. Corpora amylacea could be an indicator of neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19: 269-76.
- Singhrao SK, Neal JW, Piddlesden SJ, Newman GR. New immunocytochemical evidence for a neuronal/oligodendroglial origin for corpora amylacea. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 66-73.
- Bergman RA, Afifi AK, Heidiger PM. Appendix III: Methods of Fixation and Staining. In: Bergman RA, Afifi AK, Heidiger PM. editors. *Atlas of Microscopic Anatomy: A Functional Approach: Companion to Histology and Neuroanatomy*. 2nd ed. Virtual hospital (a digital library of health information) 1999 [370 screens]. Available from: <http://www.vh.org/adult/provider/anatomy/MicroscopicAnatomy/Appendices/Appendix3.html>.
- Kalinik M. Temelji stereologije. Drugo prerađeno izdanje. Ljubljana: Stereološka sekcija Zveze društva anatomov Jugoslavije; 1985.
- Swinscow TDW. Statistics at Square One. 9th ed. BMJ Publishing Group [serial online] 1997; [13 screens]. Available from: <http://bmj.com/collections/statsbk/index.html>.
- Rubin E, Farber JL. Cell Injury. In: Rubin E, Farber JL. editors. *Pathology*. 2nd ed. Philadelphia, London, Mexico City, New York, St. Louis, Sao Paulo, Sydney: JB. Lippincott Company; 1998. p. 3-33.
- Busard HJSM, Span JPT, Renkewek K, Renier WO, Gabreels FJM, Sloof JL, et al. Polyglucosan bodies in brain tissue: a systematic study. *Clin Neuropathol* 1994; 13: 60-3.
- Sakai M, Austin J, Witner F, Trueb L. Studies of corpora amylacea: I. Isolation and preliminary characterization by chemical and histochemical techniques. *Arch Neurol* 1969; 21: 526-44.
- Peinado MA. Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex: an overview. *Microsc Res Tech*. 1998; 43: 1-7.
- Tokutake S, Nagase H, Morisaki S, Oyanagi S. X-ray microprobe analysis of corpora amylacea. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 269-73.
- Hara M. Microscopic globular bodies in the human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986; 45: 169-78.
- Kimura T, Fujise N, Ono T, Shono M, Yuzuriha T, Katsuragi S, et al. Identification of an age-related spherical inclusion in the human brain. *Pathol Int* 2002; 52: 636-42.

20. Mizutani T, Satoh J, Morimatsy Y. Axonal polyglucosan body in the ventral posterolateral nucleus of the human thalamus in relation to aging. *Acta Neuropathol* 1987; 74: 9†12.
21. Kubota T, Naumann GOH. Reduction in number of corpora amylacea with advancing histological changes of glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophtamol* 1993; 213: 249†53.
22. Sbarbati A, Camer M, Colleti V, Osculati F. Extrusion of corpora amylacea from the marginal glia at the vestibular root entry zone. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 196†201.
23. Singhrao SK, Morgan BP, Neal JW, Newman GR. A Functional Role for Corpora Amylacea based on Evidence from Complement Studies. *Neurodegeneration* 1995; 4: 335†45.

MORPHOMETRIC AND SOME HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CORPORA AMYLACEA IN HUMAN ENTORHINAL AREA DURING THE PROCESS OF AGING

Ivan Jovanovic, Natalija Stefanovic, Sladjana Ugrenovic, Svetlana Antic, Rade Cukuranovic, Vesna Stojanovic, Jovan Stojanovic, Goran Ilic, Radovan Karadzic, Lidija Kostic, Miodrag Zdravkovic and Sandra Antovic

Corpora amylacea are calcified structures which are more frequently present in the brain of the healthy elderly subjects, as well as in the brain of the neurodegenerative diseases patients. The material was human entorhinal area tissue, which originate from the 30 cadavers which age range from 20 to 82 years. They are classified into three age groups: I (from 20 to 44), II (from 45 to 69) and III (70 years and older). Tissue was processed with standard histologic procedure. Then, it was cut into 10 µm thick sections which were stained with HE, PAS, AB PAS and Mallory's trichrome connective tissue stain. After that they were analyzed with light microscope. Morphometric analysis was performed by stereologic method. The B₁₀₀ double square lattice test system was used. Corpora amylacea were blue colored on HE stained sections. They were PAS and AB PAS positive structures. On Mallory's trichrome connective tissue stained sections they were green colored. Corpora amylacea were localized beneath the pia mater, in the outer part of the cortical molecular layer, and in the sub cortical white matter, around the blood vessels. They were not detected in cortical layers with granular and pyramidal cells. Corpora amylacea have regularly round or oval shape. During the human aging, we detected the increase of their size, without significant change of their shape. This confirms the average area and diameter significant increase during the aging. Corpora amylacea conglomerated during the human aging especially beneath the pia mater and in subcortical white matter around the blood vessels. In these formations, some corpora amylacea were in close contact, but their fusion wasn't detected. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(3): 17-22.

Key words: entorhinal area, corpora amylacea, aging, morphometric analysis