



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Браца К. Кундалић

**МОРФОЛОШКА, МОРФОМЕТРИЈСКА И
ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА
ПРОМЕНА ВЕЗИВНОТКИВНИХ ОМОТАЧА
ХУМАНОГ СУРАЛНОГ НЕРВА У ТОКУ СТАРЕЊА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Braca K. Kundalić

**MORPHOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND
IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE
CHANGES IN THE CONNECTIVE TISSUE SHEATHS
OF HUMAN SURAL NERVE DURING AGEING**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2015.

Ментор: Ванредни професор, проф. др Слађана Угреновић
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. Редовни професор, проф. др Раде Чукурановић, председник
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
2. Редовни професор, проф. др Горана Ранчић, члан
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
3. Ванредни професор, проф. др Иван Јовановић, члан
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
4. Ванредни професор, проф. др Биљана Срдић Галић, члан
Универзитет у Новом Саду, Медицински факултет
5. Ванредни професор, проф. др Слађана Угреновић, ментор и члан
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Датум одбране: _____

Израда ове докторске дисертације финансијски је потпомогнута средствима пројекта бр. 41018 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

МОРФОЛОШКА, МОРФОМЕТРИЈСКА И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ПРОМЕНА ВЕЗИВНОТКИВНИХ ОМОТАЧА ХУМАНОГ СУРАЛНОГ НЕРВА У ТОКУ СТАРЕЊА

Резиме

У току процеса старења долази до значајних структурних и функционалних промена периферног нерва, што утиче на њихову способност регенерације. Строма периферног нерва представља ослонац који одржава оптималну микрооколину за пренос нервних импулса и потпору за регенерацију нервних влакана, како у току живота, тако и након повреда.

Применом морфолошких, морфометријских и имунохистохемијских метода анализирани су узорци хуманог суралног нерва добијених на аутопсијама и након ампутација доњих екстремитета болесника са дијабетесом мелитусом и периферном васкуларном болести. Испитивање је обухватило структурне промене везивноткивних омотача у току старења, као и присуство, локализацију и квантификацију колагена типа *IV*, типа *I* и ламинина.

Резултати спроведеног истраживања показали су да са старењем долази до значајних промена у перинеуријуму и ендонеуријуму испитиваних нерава, за разлику од епинеуријалног омотача и фасцикуларне структуре нерва. Са старењем долази до значајног ремоделирања компонената екстрацелуларног матрикса перинеуријума у виду повећаног присуства колагена типа *IV*, и истовременог смањеног присуства колагена типа *I* и ламинина. У ендонеуријуму аксонска атрофија праћена је интензивнијом фиброзом и значајним повећањем присуства колагена типа *IV*, и истовременог смањеног присуства колагена типа *I* и ламинина са старењем. Код испитаника оболелих од дијабетеса установљена је изразитија ендонеуријална фиброза са већим присуством колагена типа *IV* у односу на контролне случајеве, док су код испитаника са васкуларном неуропатијом значајније промене детектоване у перинеуријумском омотачу у односу на контролне случајеве исте просечне старости са повећаним депоновањем колагена типа *IV*, типа *I* и ламинина.

Уочене разлике у променама ендонеуријалне средине и перинеуријалног омотача између сенилне, дијабетесне и васкуларне неуропатије додатно указују на значај везивноткивног матрикса нерава, и могу допринети бољем разумевању регенерације и функционалног опоравка нерва након повреде и представљају смернице за будућа истраживања на пољу неуронаука и биоинжењеринга.

Кључне речи: сурални нерв, старење, колаген, ламинин

Научна област: медицина

Ужа научна област: анатомија

УДК: 611.835:612.67

MORPHOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE CHANGES IN THE CONNECTIVE TISSUE SHEATHS OF HUMAN SURAL NERVE DURING AGEING

Summary

Structural and functional age-related changes of peripheral nerve influence the regenerative capacity of the nerve. Stroma of the peripheral nerve acts as a support that maintains optimal microenvironment for the nerve impulse conduction, as well as the scaffold for the nerve fibers regeneration.

Tissue samples of human sural nerve were analyzed using morphological, morphometric and immunohistochemical methods. The nerves were harvested during the autopsies and after lower limb amputation of the patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. This study investigated the structural changes of the connective tissue sheaths during the ageing, as well as presence, localization and quantification of collagen IV, collagen I and laminin.

Results of this study showed the presence of marked age-related changes in the perineurium and endoneurium of the investigated nerves, unlike epineurial sheath and fascicular structure of the nerve. Ageing is related to significant remodelling of the extracellular matrix of the perineurial sheath. Increased amount of collagen IV, as well as decreased expression of collagen I and laminin, were observed. Axonal atrophy in endoneurium were followed by more intense fibrosis and significant increase of collagen IV, as well as decreased amount of collagen I and laminin during ageing. In diabetic group we found significant endoneurial fibrosis with higher levels of collagen IV compared to the control, while patients with peripheral vascular disease suffered more prominent changes in the perineurial layer than age-matched control group, followed by increased deposition of collagen IV, collagen I and laminin.

Observed differences in changes of the endoneurial environment and the perineurial sheath between senile, diabetic and vascular peripheral neuropathy further suggest the importance of extracellular matrix of nerve, and may contribute to better understanding of regeneration and functional recovery of nerve after injury, offering the guidelines to the future studies in the field of neurosciences and bioengineering.

Key words: Sural nerve, ageing, collagen, laminin

Scientific field: Medicine

Special topics: Anatomy

UDC: 611.835:612.67

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

АТП – аденозин трифосфат

ГАГ – гликозаминогликан

ЕЦМ – екстрацелуларни матрикс

ММП – матриксна металопротеиназа

ПВБ – периферна васкуларна болест

ПНС – периферни нервни систем

РНК – рибонуклеинска киселина

ТИМП – ткивни инхибитор металопротеиназе

ЦНС – централни нервни систем

A_{ep} – арена епинеуријума

A_f – укупна фасцикуларна арена

AGE – продукт напредне гликације (*Advanced glycation end-product*)

ANOVA – анализа варијансе (*Analysis of variance*)

A_{sn} – арена суралног нерва

A_t – површина тестног система

BDNF – неуротрофни мождани фактор (*Brain-derived neurotrophic factor*)

d – растојање између две суседне тестне тачке

Da – далтон (*Dalton*)

DAB – диаминобензидин

Dhh – протеин дезерт хеџхог (*Desert hedgehog protein*)

D_I – унутрашњи пречник (*Outer diameter*)

D_O – спољашњи пречник (*Inner diameter*)

HRP – пероксидаза рена (*Horseradish peroxidase*)

K^+ – калијум

LM – ламинин

Mr – релативна молекулска маса

n – нерв (*Nervus*)

Na^+ – натријум

NGF – нервни фактор раста (*Nerve growth factor*)

nn – нерви (*Nervi*)

Pf – број тачака које падају на испитивану фазу

Pt – укупан број тестних тачака

RGD – аргинин-глицин-аспартат трипептид

V_{VCI} – волуменска густина колагена типа I

V_{VCIV} – волуменска густина колагена типа IV

V_{Ven} – волуменска густина ендонеуријумског садржаја

V_{Vf} – волуменска густина испитиване фазе

V_{VL} – волуменска густина ламинина

V_{Vma} – волуменска густина мијелинизованих аксона

$VEGF$ – васкуларни ендотелни фактор раста (*Vascular endothelial growth factor*)

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	2
2.1. Анатомија суралног нерва	2
2.2. Фасцикуларна структура периферног нерва	3
2.3. Васкуларизација и инервација периферног нерва	5
2.4. Везивноткивни омотачи периферног нерва	7
2.4.1. Епинеуријум	9
2.4.2. Перинеуријум	10
2.4.3. Ендонеуријум	15
2.5. Морфолошке промене након повреде нерва и регенерација	17
2.6. Компоненте екстрацелуларног матрикса	20
2.6.1. Колаген типа I	25
2.6.2. Колаген типа IV	25
2.6.3. Ламинин	27
2.7. Значај компонената ЕЦМ у инжењерингу артифицијалних водича	29
2.8. Старење периферног нервнoг система (сенилна неуропатија)	31
2.9. Васкуларна неуропатија	34
2.10. Дијабетична неуропатија	35
3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	37
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	39
4.1. Материјал	39
4.2. Методе	40
4.2.1. Анатомска микродисекција	40
4.2.2. Хистолошка обрада ткива	40
4.2.3. Хистохемијске методе	41
4.2.4. Имунохистохемијске методе	41
4.2.5. Дескриптивна морфолошка метода	42
4.2.6. Морфометријске анализе	42
4.2.7. Статистичке методе	49
5. РЕЗУЛТАТИ	51
5.1. Морфолошка и морфометријска анализа епинеуријумског омотача	51
5.1.1. Фасцикуларна организација и морфолошке карактеристике епинеуријумског омотача суралног нерва са старењем	51
5.1.2. Фасцикуларна организација и морфолошке карактеристике епинеуријумског омотача суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	52
5.1.3. Морфометријска анализа фасцикуларне структуре и епинеуријумског омотача суралног нерва са старењем	54
5.1.4. Морфометријска анализа фасцикуларне организације и епинеуријумског омотача суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	54
5.1.5. Имунохистохемијска анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у епинеуријуму суралног нерва са старењем	56

5.1.6. Имунохистохемијска анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у епинеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	58
5.2. Морфолошка и морфометријска анализа перинеуријумског омотача	60
5.2.1. Морфолошка анализа перинеуријумског омотача са старењем	60
5.2.2. Морфолошка анализа перинеуријумског омотача пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	62
5.2.3. Морфометријска анализа перинеуријумског индекса (P индекс) суралног нерва са старењем	63
5.2.4. Морфометријска анализа перинеуријумског индекса (P индекс) суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	64
5.2.5. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва са старењем	66
5.2.6. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	68
5.2.7. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва са старењем	70
5.2.8. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	73
5.3. Морфолошка и морфометријска анализа ендонеуријума	76
5.3.1. Морфолошка анализа ендонеуријума са старењем	76
5.3.2. Морфолошка анализа ендонеуријума пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	77
5.3.3. Морфометријска анализа волуменске густине мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја суралног нерва са старењем	79
5.3.4. Морфометријска анализа волуменске густине мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	80
5.3.5. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва са старењем	82
5.3.6. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	84
5.3.7. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва са старењем	86
5.3.8. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести	89
6. ДИСКУСИЈА	93
7. ЗАКЉУЧЦИ	110
8. ЛИТЕРАТУРА	112

1. УВОД

За сваки покрет и сваки осећај потребни су нам периферни нерви. Они представљају суштинску везу између тела и централног нервног система. За разлику од централног нервног система, периферни нерви поседују способност регенерације у одређеном обиму. Процес регенерације посредован је микрооколином нерва и везивним ткивом које даје основу за успостављање поновне везе између два дела прекинутог нерва. Потпорне Шванове ћелије учествују у стварању везивног ткива и супстанци које подстичу делове прекинутих аксона периферног нерва на раст. Да би дошло до спајања ових делова, потребан је везивноткивни водич преко ког ће Шванове ћелије повести проксимални део оштећеног нерва ка дисталном делу од кога је раздвојен.

Последњих неколико деценија истраживани су различити типови биолошких или артифицијалних графтова који имају за циљ да допуне или чак замене технику аутотрансплантације нервног графта. Посебни напори су улагани у развој ткивног инжењеринга, као обећавајуће мултидисциплинарне гране, која пружа велике могућности научницима и хирурзима кроз стварање артифицијалних трансплантата. Овакви графтови се састоје од физичке основе којој су додате потпорне ћелије и фактори раста или друге биомолекуларне компоненте. Основну структуру овог нервног скелета чини тубуларни нервни водич. Природни биоматеријали су захвални за израду ових водича, јер стимулишу адхезију, миграцију, раст и пролиферацију ћелија, а при том нису токсични као неки синтетички материјали. Међу природним биополимерима посебну улогу имају компоненте екстрацелуларног матрикса, као што су колаген, ламинин и фибронектин, с обзиром на њихову биолошку улогу у развоју, расту и вођењу аксона. Ово истраживање се бавило променама колагена типа I, типа IV и ламинина унутар везивноткивних омотача периферног нерва у току старења, с намером да пружи допринос новим сазнањима на овом пољу неуронаука које би, у спрези са напретком биоинжењеринга и регенеративне медицине, напослетку омогућило стварање артифицијалних нервних графтова који би по структури и функцији били што сличнији природном нервном ткиву.

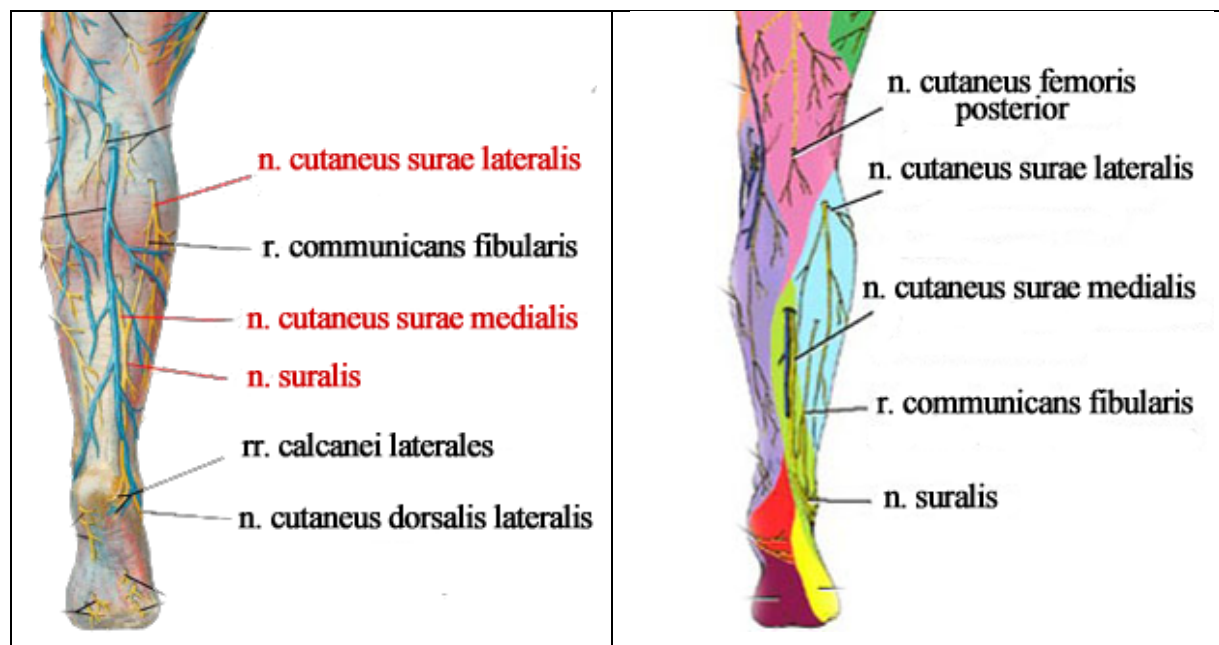
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Анатомија суралног нерва

Сурални нерв, или лисни живац (*nervus suralis*), представља сензитивни живац доњег екстремитета. Најчешће настаје на дорзалној страни потколенице спајањем унутрашњег кожног живца листа (*n. cutaneus surae medialis*), као гране голењачног живца (*n. tibialis*), и спојне лишњачне гране (*ramus communicans fibularis*), која настаје као бочна грана спољашњег кожног живца листа (*n. cutaneus surae lateralis*) (Слика 2.1.). Спојна лишњачна грана може настати и као бочна грана заједничког лишњачног живца (*n. fibularis s. peroneus communis*) или седалног живца (*n. ischiadicus*; *Ortigüela* и сар., 1987; *Mestdagh* и сар., 2001). Највећа учесталост овог типа настанка живца потврђена је бројним подацима из литературе (80,7% - *Huelke*, 1957; 71,8% - *Ilić* и сар., 1984; 80% - *Ortigüela* и сар., 1987; 67,5% - *Uluutku* и сар., 2000; 80% - *Webb* и сар., 2000; 67,6% - *Mestdagh* и сар., 2001; 58,5% - *Ugrenović* и сар., 2005; 29,4% - *Shankar* и сар., 2010) где је дефинисан као морфолошки тип *A* (*Huelke*, 1957), односно тип *I* (*Ugrenović* и сар., 2005). Хјулк (*Huelke*, 1957) описује још два типа, тип *B* код кога сурални нерв настаје као продужетак унутрашњег кожног живца листа, при чему је спојна лишњачна грана одсутна, и тип *C* код кога сурални живац настаје само од спојне лишњачне гране. Шанкар и сар. (*Shankar*, 2010) су допунили ову поделу типом *D* где сурални живац настаје директно од седалног живца. Угреновић и сар. (2005) су предложили пет различитих морфолошких типова настанка суралног живца. Поред поменутог типа *I*, описали су тип *II* код кога се спајају унутрашњи и спољашњи кожни живац листа, што је најчешће описивани тип у класичним књигама анатомије; затим тип *III* који одговара Хјулковом типу *B*, тип *IV* код ког спољашњи кожни живац листа преузима улогу суралног нерва, и тип *V* код кога постоје међусобно одвојени унутрашњи кожни живац листа и спојна лишњачна грана, који преузимају улогу суралног живца.

По свом настанку сурални нерв се спушта пут споља, приљубљен уз спољашњу главу мишића гастрокнемијуса, пратећи пут мале сафенске вене до Ахилове тетиве коју укршта, а затим пролазећи између пете и спољашњег глежња прелази на дорзалну страну стопала од чије се средине спољашње ивице наставља као дорзални живац стопала (*n. cutaneus dorsalis lateralis*) који даје завршне гране за инервацију коже *V* и

делимично IV прста (*nn. digitales dorsales proprii*). Описане су бројне анатомске варијације завршетка суралног нерва (*Solomon* и сар., 2001; *Trulsson*, 2001; *Paraskevas* и сар., 2014).



Слика 2.1. Настанак, гранање и инервационо подручје суралног нерва
(модификовано по *Hansen* и *Lambert*, 2005)

Сурални нерв припада групи живаца који се доста експлоатишу за потребе истраживања. Разлог за то је његов значај у неурохирургији где се често користи као неурографт, с обзиром на приступачну локализацију и одговарајућу дужину. Такође, биопсија суралног нерва представља једну од дијагностичких метода избора за испитивање разних видова неуропатија.

2.2. Фасцикуларна структура периферног нерва

Основна јединица сваког нерва је нервно влакно, мијелинизовано или немијелинизовано, које је уроњено у околну ендонеуријумско везивно ткиво. На попречном пресеку периферног живца јасно се види да су нервна влакна груписана у снопове, тј. фасцикулусе (раније називане фуникулусима). Сваки фасцикулус је окружен перинеуријумским везивноткивним омотачем, а заједно су окружени интерфасцикуларним епинеуријумом, чији су спољашњи делови згуснути и формирају

епифасцикуларни епинеуријум (*Silvestri, 1995; Stewart, 2003*). Фасцикулус стога представља супрацитолошку, тј. хистолошку јединицу грађе нерва.

Број и величина фасцикулуса, као и количина епинеуријумског везивног ткива које их окружује, варира како између различитих нерава, тако и у самом току истог нерва (*Stewart, 2003, Topp, 2006*). Према броју фасцикулуса нерви могу бити монофасцикуларни (грађени од једног фасцикулуса окруженог перинеуријумским омотачем и епифасцикуларним епинеуријумом), олигофасцикуларни (са 2-5 великих фасцикулуса одвојених мањом количином интерфасцикуларног везивног ткива или са више фасцикулуса мање величине које одваја већа количина интерфасцикуларног епинеуријума) и полифасцикуларни (са дифузним и групним распоредом). Број фасцикулуса у одређеном нерву расте, а њихова ареа опада у подручјима где се гране одвајају од нервног стабла, као и у зонама смештеним уз зглобове. Обрнуто ће бити у подручјима између одвајања нервних грана и између зглобова - број фасцикулуса ће опасти, а њихова површина ће се увећати (*Reina, 2000*). У близини зглобова, уопштено гледајући, фасцикулуси ће бити бројнији и тањи, те стога обавијени и заштићени већом количином перинеуријума као ослонца, што ће повећати отпорност нерва на притисак и истезање (*Lundborg, 1975*).

У литератури се описују два поларизована концепта распореда фасцикулуса у полифасцикуларним нервима. Првоописани концепт (*Stoffel, 1915; Putti, 1916; Barile, 1917*), касније и потврђен (*Stewart, 2003; Campero и сар., 2005; Hur, 2013*), сугерише да су фасцикулуси распоређени попут каблова, тј. да влакна која иду ка или од појединачних грана периферног нерва остају унутар засебних, на функционалној основи формираних фасцикулуса дуж целог живца. Алтернативу овом виђењу дао је Сандерленд (*Sunderland, 1945a*) који је описао дифузни распоред у коме се фасцикулуси, делимично или у цело, гранају, деле и поново спајају, што живцу даје изглед разгранате мреже. Овакав концепт су прихватили и други аутори (*Penkert, 2004; Topp, 2006; Peer, 2013; Reina, 2013*), с тим што преовлађује мишљење да је организација попут кабла углавном присутна у проксималним деловима живца, док на периферији, у дисталним деловима, долази до гранања фасцикулуса и одвајања влакана која дају мрежаст изглед нерву.

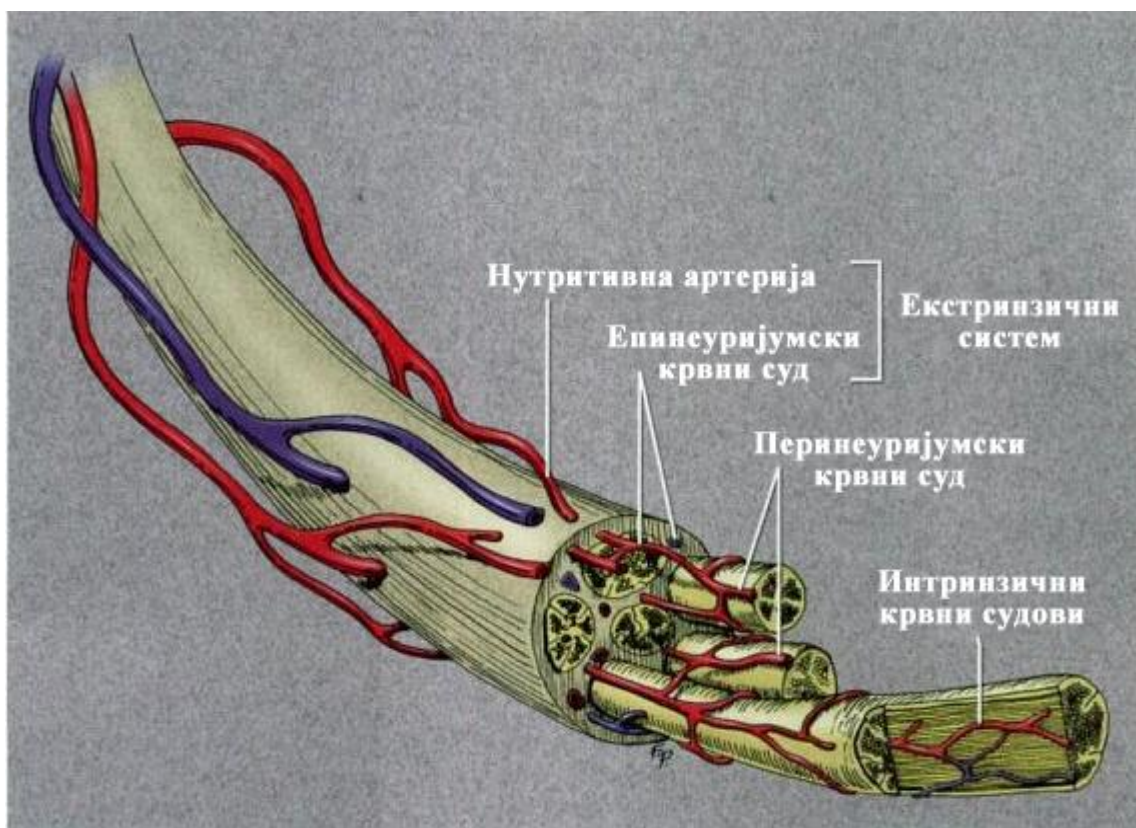
2.3. Васкуларизација и инервација периферног нерва

Нервни и васкуларни систем карактерише значајна сличност у очувању анатомске архитектуре код јединки исте врсте (*Zacchigna* и сар., 2008), што је у вези са њиховим упоредним ембриолошким развојем. Нерв добија сегментну васкуларизацију из суседних кожных, мишићних или магистралних артерија, што је образац који се не губи ни у адултном периоду (*Fachinelli*, 1981). Ови системи су често постављени дуж паралелних путања у периферним ткивима, што указује на постојање заједничких веза у развићу. Аксони и крвни судови често користе једни друге да би се успешно пратили при развоју. Тако васкуларне ћелије стварају растворљиве сигнале који помажу аксонима да прате новонастале крвне судове (*Honma* и сар., 2002; *Kuruvilla* и сар., 2004), док нерви секретују молекуле (*NGF*, *VEGF*, *BDNF*) који служе као водич крвним судовима (*Mikouyama* и сар., 2002).

Да би обезбедили адекватан доток крви, периферни нерви имају два одвојена, функционално независна васкуларна система који се међусобно анастомозирају. То су екстранеурални (екстринзични) и интронеурални (интринзични) систем (Слика 2.2.). Први се састоји из уздужно постављених артерија које се анастомозирају на површини нерва формирају површинске мреже од којих се одвајају артериоле које су, с пратећим венулама, локализоване у епинеуријуму. Од артериола полазе гране, до нивоа прекапиларних артериола, које пенетрирају перинеуријум и улазе у фасцикулус, где дају капиларе. Капилари показују лонгитудинални распоред и формирају завршну интрафасцикуларну капиларну мрежу (интринзични систем). Анастомозе између ова два система су богате и налазе се у епинеуријуму и перинеуријуму, што нерву омогућава да се одупре изменама у прокрвљености услед савијања и истезања. Капиларне мреже се могу дренирати у веће посткапиларне венуле унутар ендонеуријума које се настављају на венуле које пролазе кроз перинеуријум. Венуле и мале вене се пружају уздужно кроз епинеуријум, напослетку се придружујући већим венама које дренирају периферни нерв у околне вене (*Ubogu*, 2013).

Значај васкуларизације периферног нерва потиче из чињенице да су аксони осетљиви на исхемичне промене услед велике дистанције која постоји између тела нервне ћелије и аксонског наставка. Описане анастомозе омогућавају периферном нерву одржавање равнотеже између метаболичких потреба и перфузије живца, као и

прилагођавање потребама аксона у стањима хипоксије, исхемије, стреса и разних морфолошких промена које се јављају код различитих неуропатија (Low и сар., 1989).



Слика 2.2. Схематски приказ васкуларизације периферног нерва (Mendell и сар., 2001)

Ендонеуријумски капилари имају неколико особености које постају битне у исхемији и хиповолемији. Њихов пречник је већи но у другим ткивима, али је и растојање између њих веће, ако их упоредимо с капиларима у мозгу или мишићима, на пример. Међутим, велики дијаметар ових капилара праћен је ограниченом контрактилношћу, што нерве чини осетљивим на промене волумена крви и перфузионог притиска. Морфолошки гледано, ендонеуријумске артериоле имају слабо развијене глаткомишићне слојеве и имају тању ламину еластику интерну, што им даје мању чврстину, а већу подложност колапсу у случају пораста ендонеуријумског притиска (Reina, 2000). Заштиту ендонеуријумском садржају пружа крвно-нервна мембрана између аксона и капилара. Ако се упореде ефекат ове баријере и постојање капиларне пермеабилности, ендонеуријумски капилари формирају јаче спојеве од ендотелних ћелија епинеуријумских и перинеуријумских крвних судова, што их чини мање пропустљивим за многе супстанције, међу којима су молекули велике

молекуларне масе попут протеина. Ови капилари нису фенестрирани, а њихове ендотелне ћелије су окружене континуираном базалном ламином (Reina, 2000, 2003). Ипак, ова баријера јесте пропустљива за глукозу, што може бити узрок појаве дијабетесне неуропатије. У патолошким стањима попут аноксије и трауме пермеабилност такође може бити нарушена.

Распоред вена је сличан артеријском. Вене површних живаца се углавном уливају у дубоке вене, а када се дренирају у површне, дају анастомозу малог калибра која ће се касније улисти у дубоке вене. Вене сателитских ћелија се дренирају у оближње мишићне вене или у ваза вазорум који окружују артерије.

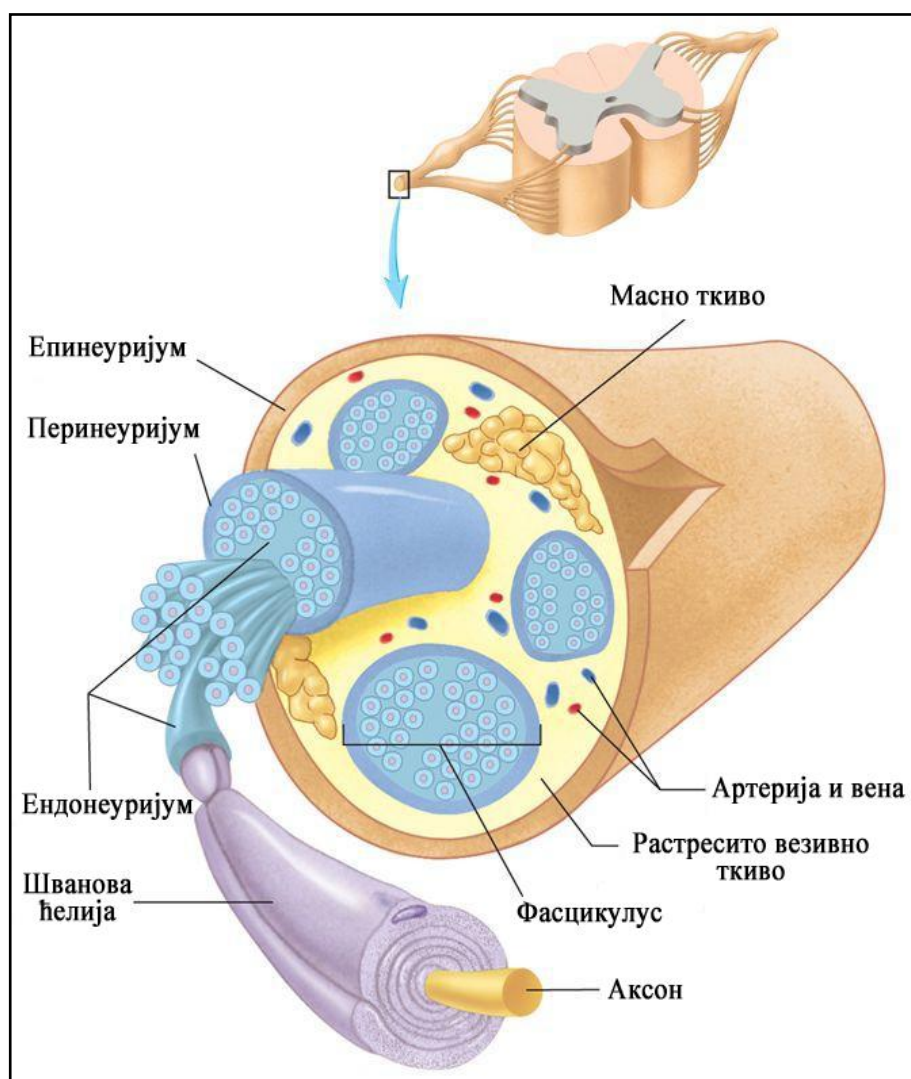
У периферном живцу постоје два одвојена типа лимфних система, међусобно одвојена перинеуријумском мембраном. Површна мрежа је смештена у епинеуријуму и дренира се у лимфатике повезане с артеријама (Mulder, 1938), док је дубока присутна у ендонеуријуму (Steer и Horney, 1968). Епинеуријумска лимфна мрежа није у контакту с перинеуријумским и ендонеуријумским простором и дренира се у веће лимфне судове и чворове. Епинеуријумски лимфни судови су обично присутни уз главне крвне судове који снабдевају периферни нерв и њихов број је знатно већи са порастом васкуларизације нерва (Agliaño, 2012). С обзиром да унутар фасцикулуса не постоје прави лимфни капилари, дубоку лимфну мрежу чине ендонеуријумски простори између аксона, као и простори између перинеуријумских ламела, који се дренирају у лимфне канале.

Специјални тип нерава који инервишу везивноткивне омотаче периферног живца чине *nervi nervorum*. Анатомијски они потичу од мијелинизованих аксона унутар нерва или од немијелинизованих аксона периваскуларног плексуса. По природи могу бити симпатетички или сензитивни (Hromada, 1963). Присутни су у виду плексуса који највећим делом леже у епинеуријуму одакле шаљу гране у перинеуријум и ендонеуријум да би се завршили у *vasa vasorum* (Reina, 2000). Рехтханд и сар. су показали су епинеуријумски и перинеуријумски судови окружени адренергичким плексусом, што није случај и са ендонеуријумским судовима (Rechthand и сар., 1986).

2.4. Везивноткивни омотачи периферног нерва

Епинеуријум, перинеуријум и ендонеуријум су везивноткивни омотачи периферног нерва (Слика 2.3.). У њима се могу наћи фибробласти, мастоцити,

макрофаги, колагена влакна груписана у виду снопова, еластична влакна и ретикулинска влакна. Ова три омотача су присутна дуж целог нерва, а њихова дебљина се смањује са гранањем главног стабла. Индивидуалне карактеристике ових омотача допуштају истезање нерва које је омогућено еластичношћу еластичних влакана и мрежастом структуром колагених влакана. Овакав фиброзни састав омотача обезбеђује нерву отпорност и чврстину. Хумани исхијадични нерв, на пример, може да издржи масу од 84 килограма, а да се не покида (Reina, 2000).



Слика 2.3. Грађа периферног нерва на попречном пресеку

(<http://imgarcade.com/1/neurolemma/>)

Као адаптивни одговор на местима трења, нервни омотачи показују задебљање које, у случајевима хроничног трења, може добити ганглиоформни облик. Такви се примери могу наћи код средишњег нерва у ручном зглобу, гране пазушног нерва који

обилази горњи део тетиве трицепса надлакти, задњег међукоштаног нерва и спољашње завршне гране дубоког перонеалног живца код скочног зглоба (Reina, 2000). Код старијих пацијената јавља се задебљање сва три омотача услед облитерације нутритивних артерија живца, која је последица ендотелне пролиферације и фиброзе тунике медије (Reina, 2000).

2.4.1. Епинеуријум

У ембриолошком развоју периферног нервног система описују се три извора настанка: ћелије нервног гребена, нервна цев и мезодерм. Од потоњег ће настати тврда можданица (*dura mater*) и везивоткивни омотачи влакана периферног нерва (епинеуријум, перинеуријум и ендонеуријум) (Shantaveerappa и Bourne, 1962). У току ембрионалног развоја епинеуријум се јавља након Шванових (*Schwann*) ћелија, које су задужене за груписање финих нервних наставака, аксона. Прекурсори епинеуријумских и перинеуријумских ћелија појављују се 15. дана гестације у мишјем исхијадичном нерву, док се фибробластима сличне ћелије не уочавају пре прве године старости. Што се тиче дијаметра колагених влакана епинеуријума, након рођења долази до његовог пораста (Osawa, 1986).

Епинеуријум је кондензовани ткивни омотач који окружује и групише све фасцикулусе са спољашње површине нерва. Мезодермног је порекла и сачињен од густог везивног ткива. Захваљујући својим карактеристикама он омогућава одређену покретљивост нерву одвајајући га од суседних структура. Ова мобилност је смањена на местима поделе на субдивизије, на местима гранања на мање нервне гране, на уласку у мишићне снопове и на местима где ступа у блиски контакт са крвним судом на свом путу, при чему се нерв припаја ближе крвном суду него осталим структурама градећи при том неуроваскуларни комплекс. Епинеуријумски омотач није увек присутан у свим нервима, тако да у случају монофасцикуларног живца може бити одсутан или бар толико танак да га је тешко препознати. Ово важи и за нервне завршетке где се епинеуријум постепено истањује до ишчезнућа. Дебљина епинеуријума је различита од нерва до нерва, али и на различитим тачкама дуж самог нерва. У литератури се наводи пример улнарног живца код кога епинеуријум у пределу унутрашњег епикондилуса хумеруса износи 22% површине пресека нерва, док код исхијадичног нерва у глутеалној регији површина епинеуријума заузима 88% (Sunderland, 1978). У начелу, епинеуријумски омотач заузима од 30 до 75% укупне површине нерва (Sunderland,

1949, 1965). Постотак епинеуријума је више сразмеран броју фасцикулуса него величини, па ће он бити већи код живаца који имају већи број мањих фасцикулуса но код оних с мањим бројем већих фасцикулуса.

Епинеуријум се углавном састоји од колагених влакана постављених уздужно на осу нерва, затим од малог броја еластичних влакана, масног ткива, ретких фибробласта, мастоцита (*Olsson*, 1971), крвних судова и финих нервних влакана која инервишу крвне судове (*Waggener* и *Beggs*, 1967; *Burkel*, 1966). Пречник колагених влакана у епинеуријуму износи 60-110 нанометара у заједничком перонеалном нерву човека, што их чини дебљим у односу на колагена влакна у ендонеуријуму (*Tohgi* и сар., 1977). Жунквејра (*Junqueira*) и сар. (1979) су нашли да колаген у епинеуријуму припада типу I, што је Салонен касније допунио сазнањем да су подједнако присутна и влакна колагена типа III (*Salonen*, 1987). Еластична влакна су присутна у мањем проценту у односу на колаген, али њихов дијаметар износи од 250 до 500 нанометара (*Ferreira*, 1987). Адипозно ткиво је присутно интерфасцикуларно, док га је теже пронаћи унутар фасцикулуса. Његова количина се повећава код гојазних пацијената, а сразмера према фасцикуларном садржају варира како од нерва до нерва, тако и на различитим местима унутар самог нерва. Значајне количине масног ткива се могу наћи у исхијадичном нерву, за разлику од живаца горњег екстремитета (*Reina*, 2000). Заједнички перонеални и тибијални нерв садрже мање адипозног ткива од исхијадичног нерва, док између претходна два више масног ткива постоји у тибијалном живцу (*Sunderland*, 1945b). У епинеуријумском омотачу можемо наћи и крвне судове већег калибра, лимфне судове и мале нервне завршетке који инервишу крвне судове (*nervi nervorum*) (*Sunderland* и *Bradley*, 1949).

Гледано у целини, епинеуријум обезбеђује таласаст изглед живчаном стаблу на његовом путу, што омогућава елонгацију нерва за време покрета екстремитета. Ова функција добија додатну сврху заштите у случају постојања радијално постављене силе која тежи да компримује нерв.

2.4.2. Перинеуријум

Перинеуријум периферног нерва настаје као продужетак паучинасте можданице (*arachnoidea mater*). Развиће перинеуријума је проучавано на анималним ембрионалним живцима. Три фазе развића перинеуријума су описане у студији рађеној на кокошијем исхијадичном нерву (*Du Plessis* и сар., 1996). Прва фаза је рана

примитивна фаза у току које се ембрионални паренхим може разликовати од околног мезенхима. Аутори указују на мезенхимско порекло перинеуријума чије ћелије имају изглед фибробластима сличних ћелија. Другу фазу представља прелазна фаза диференцијације која је у вези са стварањем вишеслојне ћелијске мреже око комплекса који чине Шванова ћелија и аксон. У овом периоду се Шванова ћелија налази на најактивнијем ступњу пролиферације. У трећој, финалној фази долази до сазревања перинеуријумског омотача који показује особине које одговарају функционалној баријери.

Бројне су студије доказале да фактори које ослобађају комплекси између Шванове ћелије и аксона могу бити одговорни за диференцијацију перинеуријума и организацију околног мезенхима (*Du Plessis* и сар., 1996; *Jessen* и *Mirsky*, 1999; *Parmantier* и сар., 1999). Сигнали из Шванових ћелија су заправо и потребни за развој перинеуријумског омотача и транзицију мезенхимних ћелија у епителу сличне структуре које изграђују перинеуријумску цев (*Jessen* и *Mirsky*, 1999; *Parmantier* и сар., 1999; *Sharghi-Namini* и сар., 2006). Ово је подржано налазом да је морфологија адултног нерва значајно измењена ако недостаје протеин назван Дезерт хеџхог (*Desert Hedgehog, Dhh*), који припада протеинима породице Хеџхог насталим од Шванових ћелија. Услед овог недостатка, перинеуријумске ћелије не показују експресију протеина пукотинастог споја конексина 43 (*Jessen* и *Mirsky*, 1999; *Mirsky* и сар., 2002; *Parmantier* и сар., 1999). Дефицијенција *Dhh* утиче на функцију крвно-нервне баријере у перинеуријуму. Последице се огледају у повећаној пропустљивости перинеуријума како за велике протеине, тако и за нежељене ћелије (*Parmantier* и сар., 1999). Такође, *Dhh* је битан у синтези колагена те његов мањак доводи до редукције синтезе, што сугерише да је *Dhh* укључен у формирање перинеуријума и епинеуријумског везивног ткива (*Bunge* и сар., 1989; *Olsson*, 1990). Недостатак *Dhh*, пак, ствара бројне сложеније ефекте на перинеуријум и ендонеуријум (*Bunge* и сар., 1989; *Jessen* и *Mirsky*, 1999; *Parmantier* и сар., 1999).

Перинеуријум је омотач који окружује сваки појединачни фасцикулус и који се састоји од скупа ћелијских ламина између којих су постављена колагена влакна. Раније је био познат и као Ранвијеов (*Ranvier*) ламинарни омотач или Робинов (*Robin*) перинеуријум. Када овај омотач окружује фасцикулус малог калибра, поседује транспарентан изглед и назива се Хенлеов (*Henle*) омотач. Перинеуријум чини неколико концентричних слојева који се састоје од низа међусобно повезаних плочастих ћелија које се зову перинеуријумске ћелије. Оне су полигоналног облика,

пљоснате, дебљине мање од 0,1 микрометра. Њихова базална мембрана је дебљине до 0,5 микрометара (*Gambe*, 1964), састављена од протеогликана, као што су хепаран сулфат, и адхезивних гликопротеина, попут фибронектина, тенасцина и ламинина (*Paetau* и сар., 1980). Потоњи је посебно присутан у базалним мембранама унутрашњих слојева перинеуријумског омотача (*Schiff* и *Rosebluth*, 1986). Перинеуријумске ћелије садрже спљоштена једра, гранулисану цитоплазму с ретким митохондријама и пиноцитозним везикулама величине до 0,1 микрометра (*Hope* и *Bourne*, 1963; *Klemm*, 1970). Број слојева ћелија зависи од величине фасцикулуса и удаљености од централног нервног система (*Shanta* и *Bourne*, 1968). Суседне перинеуријумске ћелије су међусобно повезане тесним спојевима по типу зонуле оклуденс и хемидезмозома који им омогућавају да створе омотач и, следствено, дифузиону крвно-нервну баријеру (*Thomas* и *Jones*, 1967; *Lieberman*, 1968). Перинеуријумске ћелије су специфичне по томе што поседују карактеристике епителних ћелија, али са друге стране имају својство контрактилности и способност продукције колагених влакана, те такође показују сличности и са глатким мишићним ћелијама и фибробластима (*Ross* и *Pawlina*, 2011). Интерцелуларни перинеуријумски простори су попуњени аморфном основном супстанцом, колагеним влакнима и ретким фибробластима (*Sunderland* и *Bradley*, 1952). Они могу да комуницирају са субарахноидалним и субдуралним просторима у централном нервном систему и дебљине су од 10 до 30 нанометара. Влакна колагена износе од 40 до 65 нанометара (*Gambe* и *Eames*, 1964; *Thomas* и *Jones*, 1967; *Thomas*, 1963) и постављена су лонгитудинално, мада нека од њих могу да заузму форму двоструког хеликса. У перинеуријуму се могу уочити три концентричне зоне. Унутрашњу зону чини перинеуријумски епител који је најближи ендонеуријуму и који се простира до самих крајева нервних завршетака (*Shantaveerappa* и *Bourne*, 1962). Средишњи слој чини један слој перинеуријумских ћелија повезаних тесним спојевима, који је од ендонеуријума одвојен субперинеуријумским простором (*Shantaveerappa* и *Bourne*, 1964, 1966). Ова зона састављена је од 3 до 15 концентричних ламела (*Thomas*, 1963), при чему је њихов број пропорционалан величини фасцикулуса, и њена дебљина износи од 5 до 20 микрометара. Спољашњи слој је транзициона зона к епинеуријуму где се губи ламинарна ћелијска грађа и јављају се дебља колагена влакна. Број ламела се смањује на местима гранања нерва и на нервним завршцима (*Burkel*, 1967).

Перинеуријумске ћелије показују високу метаболичку активност и у њиховој цитоплазми су нађени ензими дефосфорилације, попут АТП-азе, 5'-нуклеотидазе,

креатинфосфатазе, глицерофосфатазе. Могуће је да је једна од улога ових ћелија да одржавају одговарајућу концентрацију натријума, фосфора и глукозе у непосредној близини нервних влакана (*Shantaveerappa* и *Bourne*, 1962, 1963; *Llewelyn* и *Thomas*, 1987).

Перинеуријум формира тубуларни омотач, дебљине од 1,3 до 100 микрометара (*Sunderland* и *Bradley*, 1952; *Tohgi* и сар., 1977), који омогућава одређене покрете аксона унутар фасцикулуса. У начелу, с порастом броја фасцикулуса смањује се дебљина перинеуријумског омотача. Код средишњег живца, на пример, перинеуријум је у ручном зглобу дебљи него у пазушној јами. Код улнарног живца, пак, разлика у дебљини мерена у ова два подручја је мање изражена (*Reina*, 2000).

Мијелинско влакно може имати само један слој перинеуријума, а такође један слој може обухватати више немијелинизованих влакана и њима одговарајућих Шванових ћелија. Код мијелинизованих влакана перинеуријумски омотач се завршава пред неуромускуларним спојем, на 1 до 1,5 микрометар пре контакта (*Saito* и *Zacks*, 1969; *Kerjaschi* и *Stockinger*, 1970), као и пред капсулом која обухвата нервне завршетке, нпр. код Пачинијевог (*Pacini*) и Мајснеровог (*Meissner*) телашца (*Shanta* и *Bourne*, 1968). Код немијелинизованих влакана се завршетак перинеуријума може лакше уочити, при чему се запажа смањење броја слојева перинеуријума. Перинеуријум ствара баријеру дуж целог нерва и постоје свега три зоне у којима је одсутан, што омогућава комуникацију између епинеуријума и ендонеуријума. Та места су присутна на нервним завршцима, на тачкама уласка и изласка крвних судова који исхрањују нерв и на местима где ретикулинска влакна продиру кроз перинеуријум. На местима уласка и изласка крвних судова перинеуријум се састоји од танке опне која га одваја од ендонеуријума.

Функција перинеуријума је у одржавању интерфасцикуларног притиска и очувању ефекта баријере (*Lundborg*, 1975; *Olsson* и *Kristensson*, 1973; *Soderfeldt* и сар., 1973). Перинеуријум преноси притисак на ендонеуријум који са своје стране преноси интрацелуларни притисак на аксон. У случају Валерове (*Waller*) дегенерације, услед деформације ендонеуријумске тубе долази до пада интрафасцикуларног притиска и тензије перинеуријума, што је удружено с прогресивним скврчавањем фасцикулуса (*O'Daly* и *Imaneda*, 1967). Перинеуријум представља додатну заштиту нерва на местима рамификације, што се може запазити по задебљању његовог пречника на тим подручјима.

У току сазревања долази до промена функције перинеуријума. Перинеуријумске ћелије се појављују прве у процесу матурације. У почетку оне садрже много гликогенских гранула, базална мембрана је одсутна и не постоје тесни спојеви између њих, што се разликује од адултних ћелија које учествују у стварању дифузионе баријере (Osawa и Ide, 1986; Kristensson и Olsson, 1971; Gambe и Breathnach, 1965; Kristensson, 1965; Ochoa, 1971). Ово омогућава снабдевање и транспорт хранљивих материја до аксона и припадајућих им Швановим ћелијама, будући да у овом почетном стању ендонеуријумски крвни судови нису још увек присутни. Када почне стварање и секреција инсулина у ембриону, крвни судови почињу да запоседају паренхим нерва, што смањује продукцију гликогена у перинеуријумским ћелијама (Ochoa, 1971, Duckett и Scott, 1913). Ефекат баријере је снижен код незрелих нерава (Shield и сар., 1986) и код пацијената с малнутрицијом, што може имати значајне последице када дође до њеног оштећења. Код пацова перинеуријумска баријера не успоставља своју функцију пре треће недеље (Kristensson и Olsson, 1971). Перинеуријум ограничава ширење инфекције и повезаних запаљењских реакција. Ако живац пролази кроз инфицирано подручје интактног перинеуријума, неће доћи до последица у виду дисеминације процеса и неуритиса, али се може јавити задебљање перинеуријума као инфламаторни одговор. Ако је, пак, континуитет перинеуријума прекинут, инфекција продире у фасцикулус и долази до брзе дисеминације (Sunderland, 1946). За разлику од наведеног, оштећење епинеуријума не повлачи за собом штетне ефекте.

Перинеуријумска баријера има неких сличности са крвно-можданом баријером (Aker, 1972). Прво овакво поређење потиче од Дојникова (Doinikow, 1913). Ваксман (Waksman, 1961) је након њега потврдио да ова баријера спречава пролаз молекула велике молекуларне масе до нервних влакана и ендонеуријума. Надаље су их пратили Олсон (Olsson), који је користио обележени албумин (Olsson, 1968; Olsson и сар., 1971), и Вагенер и сар. (Waggener, 1965), који су употребили феритин. Оба ова молекула су дијаметра око 10 нанометара. Ове супстанце су убризгане у близину епинеуријума и потом задржане у перинеуријуму да би се након 3 сата нашле између слојева перинеуријумског омотача не продирући и даље у ендонеуријумски простор. Клем (Klemm, 1970) је инјисирао пероксидазу засебно у ендонеуријум и епинеуријум, али ова супстанца није могла да дифундује кроз перинеуријум. Забележена је једино трансцелуларна миграција пиноцитозних везикула које су биле присутне унутар перинеуријумских ћелија (Latker и сар., 1985; Shinowara и сар., 1981). Маркиране супстанције су нађене у крвним судовима епинеуријума и у спољашњим слојевима

перинеуријума, али не и у околини ендонеуријалних крвних судова нити у унутрашњим слојевима перинеуријума. Ова селективна и рестриктивна пропустљивост се објашњава постојањем тесних спојева између ендотелних ћелија крвних судова ендонеуријума и постојећих специјализованих спојева између перинеуријумских ћелија унутрашњих ламина овог омотача (*Shantaveerappa* и *Bourne*, 1964, 1966; *Olsson* и *Kristensson*, 1973; *Olsson* и *Resse*, 1971; *Ohara* и *Ikuta*, 1985).

Седерфелт (*Söderfelt* и сар., 1973) је употребом пероксидазе рена на кадаверима заједно са сарадницима открио да ефекат баријере у перинеуријуму може постојати у исхемичним условима и 22 сата након смрти, а да након тога долази до пропуштања протеина. Олсон је са Кристенсоном (*Olsson* и *Kristensson*, 1973) истраживао *in vivo* како лезија нерва утиче на пропустљивост баријере и нашао да је овај ефекат реверзибилан у периоду од 2 до 30 дана након оштећења.

2.4.3. Ендонеуријум

Ендонеуријум је фини тубуларни омотач који директно належе на Шванове ћелије и доприноси одржавању нормалног унутрашњег окружења фасцикулуса кога чине аксони и наведене Шванове ћелије (*Seneviratne* и *Peiris*, 1970). Ендонеуријумски омотач који окружује и мијелинизоване и немијелинизоване аксоне састоји се из два различита слоја, спољашњег кога чине уздужно постављена колагена влакна и унутрашњег у коме су колагена влакна присутна у ирегуларном распореду (*Sunderland* и *Bradley*, 1950). Раније су се ови слојеви називали по ауторима који су их открили, тако да се спољашњи називао Хенлеов слој или слој Кеја (*Key*) и Рецијуса (*Retzius*), док је по Пленку (*Plenk*) и Лејдлоу (*Laidlaw*) име добио унутрашњи слој (*Reina*, 2000). Колагена влакна унутрашњег слоја су у блиском контакту са базалним ламинама Шванових ћелија. Ова базална ламина садржи колаген типа IV и под електронским микроскопом се види како се састоји из једног дебљег и једног провидног слоја који окружује Шванове ћелије. Након примене имунохистохемијског бојења, утврђено је постојање ламинина у оба слоја, сем у подручјима Ранвијеових сужења где се налазе фибронектин и протеогликан хепаран сулфат (*Paetau* и сар., 1980; *Schiff* и *Rosebluth*, 1986). Комплекс ендонеуријума и Шванове ћелије има улогу као изолаторни механизам који спречава интерференцију у спровођењу нервних импулса између суседних аксона (*Esplin*, 1962).

Особине ендонеуријумског колагена су сличне оном у перинеуријуму, дијаметар ових влакана износи између 30 и 60 нанометара, и међу њима се повремено могу наћи микрофибрили (*Friede и Bischhausen, 1978*). Различита су мишљења о типу колагена; док једни сматрају да се ради о типу *III*, други тврде да се ради о типовима *I* и *II*. Биохемијске студије су показале да је колаген типа *I* доминантан. У ендонеуријуму колаген такође може бити окружен базалном мембраном, при чему се око колагеног влакна уочава двострука мембрана или може бити обухваћен базалном ламином Шванових ћелија немијелинизованих аксона (*Usbiki и Ide, 1986*). На овај начин колаген пружа отпорност истезању живца. У ендонеуријуму површних живаца присутна је већа количина колагена у поређењу с дубоким, што се може објаснити његовом улогом у појачаној заштити поткожних нерава. Што се тиче порекла колагена у ендонеуријумском простору, сматра се да потиче од Шванових ћелија којих има девет пута више него фибробласта. У прилог овој тези иде чињеница да су колагена влакна присутна у овом одељку живца пре појаве фибробласта. У току ембрионалног развића ендонеуријум је представљен као острва колагених влакана испреплетаних Швановим ћелијама и ретким фибробластима који стварају тај колаген. С појавом фибробласта у ендонеуријуму и њиховим умножавањем, количина ендонеуријумског колагена нагло опада.

Још један тип ћелија који се може наћи у ендонеуријуму су макрофаги. Њих карактерише присуство великих хетерогених гранула у цитоплазми и налазе се у периваскуларним подручјима (*Olsson, 1968*). Према Гамбу (*Gambe, 1964*) макрофаги не постоје између нервних коренова и сензитивних ганглиона и чине свега 2-4% укупног броја ћелија (*Oldfors, 1980*). Макрофаги су углавном смештени близу крвних судова или између перинеуријумских ламела. Имају важну литичку активност која је посредована киселом фосфатазом, као и високи капацитет за фагоцитозу, што је доказано убризгавањем колоидног угљеника у њихову близину. Када макрофаги фагоцитују остатке мијелинских влакана, стварају специјализовани контакт с ендотелним ћелијама. Поред њих, и фибробласти ендонеуријума имају фагоцитну улогу (*Schubert и Friede, 1981*). За разлику од ендонеуријума хуманог или зечијег нерва, код пацова има знатно више мастоцита. Заједно с епинеуријумом и перинеуријумом, ендонеуријум доприноси отпору на истезање аксона под тензијом. Ова функција је олакшана вијугавом путањом аксона. Ове ондулације се могу видети под косим осветљењем на светлосном микроскопу као дијагоналне, цик-цак пруге у епинеуријуму и перинеуријуму које су по аутору назване Фонтаниним (*Fontana*)

спиралним тракама (*Clarke и Bearn, 1972*). Међутим, када се нерв подвргне благом истезању, овај визуелни ефекат нестане.

Повремено се у ендонеуријуму могу наћи хијалина телашца звана Реноова (*Renaut*) телашца. Њихова тела су пречника 20-150 микрометара, а дужине од неколико стотина микрометара. Ова телашца су састављена од неорганизованих колагених влакана и придружених фибробласта (*Asbury, 1973*). У већем су броју присутни на местима где је живац подложен компресији, као што је случај са средишњим живцем у ручном зглобу и улнарним живцем у лакту.

2.5. Морфолошке промене након повреде нерва и регенерација

Након што нерв претрпи трауматску повреду долази до развоја комплексних морфолошких и метаболичких патофизиолошких промена. Промене се дешавају на нивоу тела нервне ћелије, проксималном, дисталном патрљку повређеног нерва и дисталним завршцима нервних влакана (*Geuna и сар., 2009*).

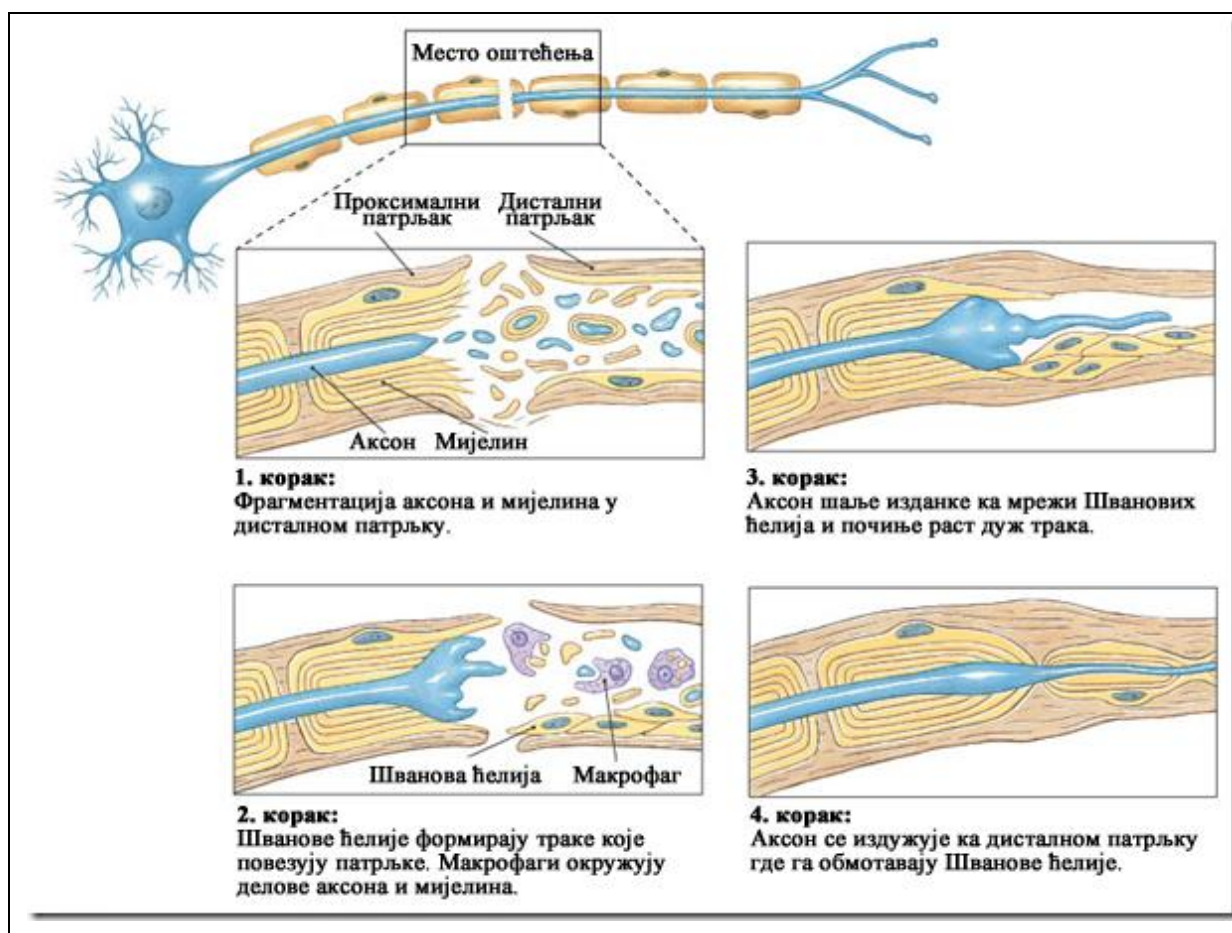
Трансекција аксона (аксотомија) представља ампутацију већег дела аксоплазматског волумена од тела нервне ћелије. Након повреде наступају дубоке промене у структури и функцији ћелијског тела (и моторних и сензитивних неурона) које могу довести и до ћелијске смрти (*Purves и Nja, 1978*). Преживљавање неурона након аксотомије зависи од више фактора: типа, природе и осетљивости неурона; удаљености лезије аксона од тела ћелије; присуство дугих колатерала пре места лезије као и циљних ћелија и других фактора попут стања крвних судова (*Stefanović и сар., 2003*). Промене у телу неурона настају брзо, неколико сати након повреде. Најпре долази до хроматолизе која је праћена разлагањем Нислове супстанце, отицањем ћелијског тела и нуклеуса, што је праћено нуклеарном ексцентричношћу. Уместо преношења нервног импулса повређени неурон почиње да фабрикује структурне компоненте потребне за регенерацију нервног влакна (*Lieberman, 1971; Muller и Stoll, 1998*). Од синтезе неуротрансмitera и неуропептида прелази на синтезу цитоскелетних протеина и протеина удружених са растом (*Fornaro и сар., 2008*).

У проксималном сегменту повређеног нервног влакна долази до развоја дегенерације на извесној дистанци уназад од места аксотомије, најчешће до следећег Ранвијеовог чвора остављајући ендонеуријумске тубусе (базалне ламине Шванових ћелија) као празне цилиндри. Овај процес се назива ретроградном дегенерацијом

(Geuna и сар., 2009). На месту лезије долази до већег прилива јона калцијума и до активације протеазе зависне од калцијума која доводи до дезинтеграције аксоплазматских микротубула и неурофиламената. Унутар 48 сати од повреде и мијелински омотач подлеже фрагментацији, дејством ензима бива претворен у грануле триглицерида, које заједно са осталим продуктима дегенерације фагоцитију макрофаги и Шванове ћелије (Weller и Cervós-Navarro, 1977; Williams и сар., 1995). Процес регенерације започиње рано, 36 часова након повреде нервног влакна и то из проксималног патрљка повређеног влакна на коме се формира конус раста. Из конуса раста полазе бројни колатерални и терминални аксонски изданци (младице), дебљине до 1 μm , дужине 5-50 μm (Ghalib и сар., 2001; Stefanović и сар., 2003). Ницање аксонских изданака најчешће иде у два таласа, при чему младице напредују дистално унутар ендонеуријумских тубуса (Sunderland, 1978). Аксонски изданци функционишу као сензори за детектовање присуства Шванових ћелија и њихове базалне ламине. Са друге стране, конус раста делује митогено на Шванове ћелије те оне пролиферишу ка дисталном патрљку повређеног влакна или ка циљним ћелијама. Регенерисани аксонски изданак проналази ендонеуријумски тубус и ураста у њега након чега следи раст и елонгација аксона просечном брзином 3,5-4 mm на дан (Stoll и Muller, 1999; Stefanović и сар., 2003). У један ендонеуријумски тубус улази и до 20 изданака од којих најчешће један наставља сазревање. Након успостављања везе са циљном структуром наступа ремијелинизација по ембрионалном обрасцу. Да би достигли дистални сегмент напредујући аксони морају да прођу кроз критичну ареу између проксималног и дисталног патрљка повређеног нервног влакна („*interstump*“ зона). Коначни успех регенерације у великој мери зависи од оног шта се дешава на овом нивоу и на који начин локална, и хемијска, и целуларна, реакција може утицати на раст и усмеравање изданака (Geuna и сар., 2009).

Након пресецања нерва цео дистални сегмент прекинутог влакна такође подлеже спором процесу дегенерације који је познат као Валерова антероградна дегенерација. Овај процес започиње одмах након повреде и праћен је дезинтеграцијом аксонског цитоскелета и мијелинског омотача (Слика 2.4.). Шванове ћелије и макрофаги се регрутују на месту повреде и током 3-6 недеља фагоцитију сав мијелин и ћелијски дебрис. Нестаје мијелински омотач дисталног сегмента нервног влакна али остају Шванове ћелије са њиховом базалном ламином (Lubińska, 1982). Губитак контакта Шванове ћелије са аксоном представља сигнал за пролиферацију самих Шванових ћелија, које се организују у колумне (тубусе) назване Бингнерове (Büngner)

траке у које улазе регенеришући аксони. Не само да воде регенеришуће аксоне ка циљним структурама, Шванове ћелије истовремено повећавају синтезу неколико типова неуротрофичких фактора попут *NGF* и разних неуротрофина који стимулишу ницање и раст аксона (*Thoenen* и сар., 1988; *Geuna* и сар., 2007).



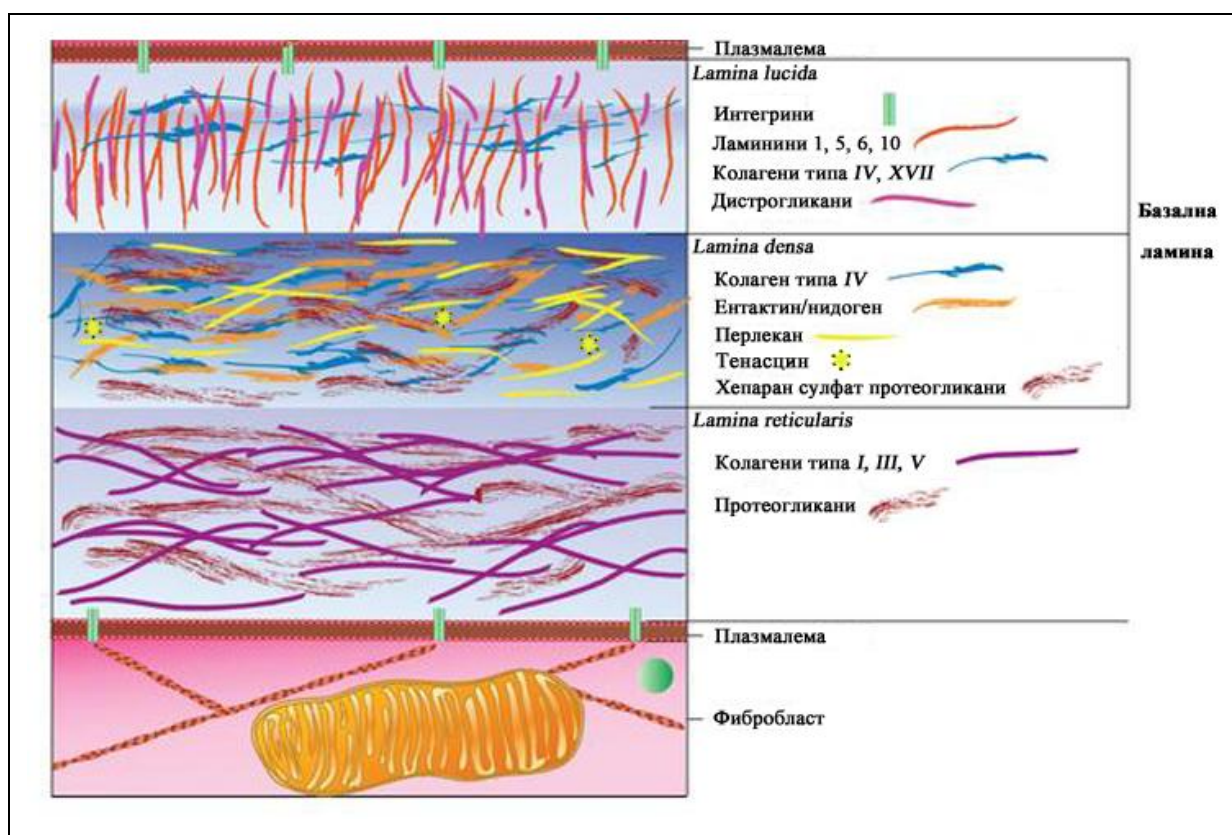
Слика 2.4. Схематски приказ лезије и процеса регенерације нерва (*Marieb*, 2003)

Напредовање регенеришућих аксона у дистални ендонеуријумски тубус је такође промовисано факторима попут ламинина, фибронектина и разних адхезивних молекула (*Liu*, 1996; *Hall*, 1997). Почетан број растућих изданака присутних у дисталном сегменту може знатно превазићи број „родитељских“ аксона проксималног сегмента повређеног нерва. С временом се један број регенерисаних аксона, који су досегли циљне структуре, увећава, сазрева и поново стиче дијаметар влакна који је приближан нормалном. Остатак регенерисаних аксона који нису доспели до циљне структуре нестаје (*Griffin* и *Hoffman*, 1993). Након неколико месеци регенерације нерва формира се реорганизовано нервено стабло са већим бројем минијатурних одељака, при чему је сваки окружен новим перинеуријумом. Овај феномен је познат као

компартиментизација (Geuna и сар., 2009). За неколико месеци успоставља се перинеуријумска баријера. У случајевима пролонгиране денервације дисталног сегмента повређеног нерва долази до повећане акумулације колагена и значајне измене типова колагена присутних у ендо- и перинеуријуму, што доводи до стварања „ожиљка“ у критичној „*interstump*“ зони (Salonen и сар., 1985).

2.6. Компоненте екстрацелуларног матрикса

Екстрацелуларни матрикс (ЕЦМ) чине везивоткивна влакна и основна супстанца (гликозаминогликани, протеогликани и гликопротеини), које стварају саме ћелије и секретују их у екстрацелуларни простор (Слика 2.5.). Раније се сматрало да ЕЦМ само одређује чврстину ткива у коме се налази, али данас се зна да, поред структурне потпоре, обезбеђују биолошке сигнале, има важну улогу у ћелијској адхезији, миграцији, пролиферацији, диференцијацији, експресији гена и преживљавању (Aszodi и сар., 2006; Yurchenco и Cheng, 1994).



Слика 2.5. Састав базалне мембране (Menter и DuBois, 2012)

Компоненте ЕЦМ су основна супстанца, везивноткивна влакна и ткивна течност (Junqueira и сар., 1995). Основна супстанца је аморфни материјал сличан гелу. Састоји се од гликозаминогликана, протеогликана и гликопротеина. Гликозаминогликани (ГАГ) дуги су, несавитљиви и неразгранати полисахариди. Састављени су од дисахаридних поновака у којима је увек присутан аминокшећер (*N*-ацетилгликозамин или *N*-ацетилгалактозамин), док је друга јединица дисахаридног поновка уронска киселина (идуронска или глукуронска). Пошто је аминокшећер (хексозамин) најчешће сулфатисан и поседује и карбоксилне групе, изразито су негативног набоја (полианјони) и привлаче катјоне као што је *Na*. Висока концентрација јона *Na* у основној супстанци привлачи екстрацелуларну течност која хидрира ЕЦМ и доприноси резистенцији према дејству компресивних сила.

У сулфатисане ГАГ спадају: кератан сулфат, хепаран сулфат, хепарин, хондроитин-4 и 6 сулфат, и дерматан сулфат, и они се састоје од мање од 300 дисахаридних поновака. Једини несулфатисани ГАГ је хијалуронска киселина и може имати и до 10 000 дисахаридних поновака. Гликуронска киселина је велики макромолекул који не формира ковалентне везе са протеинима. За њу се преко везујућих протеина могу везивати протеогликани и на тај начин се формирају протеогликански агрегати.

Сви гликозаминогликани се синтетишу у Голџијевом апарату осим хијалуронске киселине која се синтетише као слободан линеарни полимер на цитоплазматској страни плазмалеме уз учешће ензима хијалуронан синтетазе. Ови ензими су интегрални мембрански протеини који каталишу полимеризацију и олакшавају трансфер новоформираног макромолекула у ЕЦМ (Ross и Pawlina, 2011; Anđelković, 2001).

Протеогликани су макромолекули који настају када се сулфатисани ГАГ ковалентно вежу за протеинско језгро (средишњи протеин). Могу бити различите величине, од 50 000 *Da* (декорин и бетагликан) до 3 милиона *Da* (агрекан). Многи протеогликани се везују за хијалуронску киселину градећи протеогликанске агрегате који су одговорни за гел стање ЕЦМ и делују као баријера брзој дифузији водених депозита кроз ЕЦМ (Ross и Pawlina, 2011).

Протеогликани успоравају брзу пенетрацију неких микроорганизама и метастатских ћелија, а са друге стране олакшавају нормално ћелијско кретање и миграцију. Протеогликани су укључени и у процес ћелијске сигнализације будући да

поседују везујућа места за неке сигналне молекуле. Неки протеоглигани, као нпр декорин су неопходни за формирање колагених влакана (Ross и Pawlina, 2011).

Гликопротеини су велики макромолекули који поседују неколико везујућих домена. Они се везују за протеине на ћелијској површини који се називају интегрини, за колагена влакна и за протеоглигане, и на тај начин повезују различите компоненте ткива. Најбитнији гликопротеини су фибронектин, ламинин, тенасцин, ентактин, хондронектин и остеонектин.

Фибронектин је велики димер који се састоји из две сличне полипептидне субјединице (свака око 220 000 Da). Оне су дисулфидним мостовима повезане преко својих карбоксилних крајева. Фибронектин продукују фибробласти. Везујуће место на фибронектину за интегрине ћелијске мембране назива се RGD секвенца, а састоји се од три аминокиселинске резидуе (аргинин, глицин, аспартат). Фибронектин је такође присутан и у крви (*plasma fibronectin*), а функција му је да олакша зарастање рана, учествује у процесу фагоцитозе и коагулације. Он такође привремено може да буде и везан за плазма мембрану (*cell surface fibronectin*). Фибронектин је битна компонента базалних ламина (*Schwarzbauer и DeSimone, 2011*)

Ламинин је велики гликопротеин (950 000 Da) који се састоји од три велика полипептидна ланца: α -, β - и γ -ланца. Ова три ланца у том распореду држе дисулфидни мостови. Локација ламинина је практично стриктно везана за базалну ламину. Међутим, он поседује везујућа места и за хепаран сулфат, колаген тип IV, ентактин и ћелијску мембрану (*Aumailley, 2013; Hohenester, 2013*).

Ентактин (нидоген) је сулфатисани гликопротеин који се веже за молекул ламинина на месту сусрета три краћа крака молекула. Такође се везује за колаген тип IV и на тај начин олакшава везивање ламинина за мрежу колагена (*Hohenester, 2013; Ross и Pawlina, 2011*).

Тенасцин је велики гликопротеин састављен од 6 полипептидних ланаца, међусобно повезаних дисулфидним мостовима. Овај макромолекул има везујућа места за трансмембрански протеогликан синдекан и за фибронектин. Он је махом присутан у ембрионском ткиву где је битан за маркирање путева за ћелијску миграцију (*Chiquet-Ehrismann и Tucker, 2011*).

Хондронектин и остеонектин су слични фибронектину. Хондронектин поседује везујућа места за колаген тип II, хондроитин сулфат, хијалуронску киселину и интегрине хондробласта и хондроцита. Остеонектин поседује домene за везивање са типом I колагена, протеоглиганима и интегринима остеобласта и остеоцита. Такође

може да олакша везивање кристала хидроксиапатита за колаген типа II у костима (Ross и Pawlina, 2011; Anđelković, 2001).

Молекуле ЕЦМ који су присутни у базалним мембранама периферног нерва продукују Шванове ћелије (Chernousov и Carey, 2000). Познато је да неке компоненте ЕЦМ, као што су ламинин (Labrador и сар., 1998), фибронектин (Vogelezang и сар., 1999) и колаген типа IV (Tonge и сар., 1997) помажу аксонски раст и елонгацију како у току нормалног развоја, тако и у процесу регенерације. Други молекули ЕЦМ, као што је хондроитин сулфат, могу инхибирати раст аксона (Zuo и сар., 1998). Баланс позитивних и негативних сигнала које молекули ЕЦМ шаљу Швановим ћелијама узрокује стварање јединственог одговора од кога зависи хоће ли доћи до аксонског раста и елонгације (Stevens и Jacobs, 2002).

Постоје две групе везивоткивних влакана: колагена (ту спадају колагена и ретикуларна влакна) и еластична влакна.

Колагени су најраспрострањенији гликопротеини који су у обиљу присутни у ЕЦМ периферног нерва (Pleasure, 1984; Thomas и Olsson, 1984) где играју важну улогу у развоју периферног нервног система (ПНС) и очувању нормалног функционисања периферног живца у адултном периоду (Hubert и сар., 2009). Имају карактеристичну структуру троструког хеликса и предоминантно су укључени у стварање фибриларних и микрофибриларних мрежа ЕЦМ и базалних мембрана. Досад је описано 29 типова колагена, обележених бројевима од I до XXIX, који се разликују по величини, грађи и функцији. Заједничке особине свих колагена су да су то трансмембрански или екстрацелуларни протеини, грађени од десногирог троструког хеликса састављеног од три α -ланца (Piez, 1984), а оваква структура је одређена глицинским остатком на свакој трећој позицији полипептидног ланца, при чему глицин следе две аминокиселине, и то обично пролин и 4-хидроксипролин. Овај потоњи се сматра битним за стварање интрамолекуларних водоничних веза и доприноси стабилности троструког хеликса.

Колагени су неопходни за формирање нормалног састава ЕЦМ и учествују у регулацији функције Шванове ћелије. Структурна и функционална улога породице колагена у везивном ткиву је доста проучавана, али упркос томе што чине основне делове ЕЦМ, колагени су ретко присутни у зрелом нервној систему. Тек су скорије студије показале да неурони могу експримирати неке типове колагена (Hubert и сар., 2007; Seppanen и сар., 2006; Sund и сар., 2001). Преовлађују три локације у зрелом нервној систему где се јавља експресија колагена: 1) везивно ткиво које окружује ЦНС

и ПНС, 2) базалне мембране између нервног система и других ткива (мишићно, ендотелно), као и 3) инкапсулирани нервни завршеци.

Еластична влакна ткивима пружају еластичност. Еластичност им обезбеђује молекул еластин. То је глобуларни гликопротеин ($M_r=70\,000$), богат аминокиселинама глицином и пролином, а такође садржи и специфичне аминокиселине дезмозин и изодезмозин. Ове аминокиселине стварају бројне унакрсне везе између суседних молекула еластина, тако да они остају повезани и после дејства силе истезања. Приликом истезања долази до кидања интермолекуларних нековалентних веза и влакно се истеже на 150% првобитне дужине. Након престанка дејства силе ове се везе поново успостављају. Поред еластина у еластичном влакну су присутни и микрофibriли, састављени од молекула фибрина (протеин по хемијској грађи, садржи махом хидрофилне аминокиселине) (Anđelković, 2001).

Описују се следећи типови еластичних влакана:

- 1) Окситаланска влакна су састављена искључиво од микрофibriла. Ова влакна настају прва током еластогенезе. Ова влакна практично немају еластичност и веома су резистентна према дејству силе истезања. Налазе се у дермису у близини епидермиса и чине *fibrae zonulares* у оку.
- 2) Елауинска влакна су делимично испуњена неправилним депозитима еластина између микрофibriла.
- 3) Права еластична влакна су најраспрострањенија. Еластин заузима читав средишњи део влакна, а само на периферији га окружују микрофibriли.

Ретикуларна влакна су танка ($0,5-2\ \mu m$) и формирају мрежу у одређеним органима и око неких ћелија (глатки мишић, ендонеуријум, коштана срж, лимфни чвор, слезина, око ћелија паренхимских органа – јетра, ендокрине жлезде), која омогућава значајну промену волумена. Изграђена су од колагена типа III. Влакна се састоје од фибрила дебљине око $35\ nm$ (Ross и Pawlina, 2011; Anđelković, 2001).

У периферном нервном ткиву ЕЦМ садржи бројне макромолекуле, попут колагена (I, III, IV, V), ламинина, фибронектина и других сигналних фактора (Chernousov и сар., 2008; Kemp и сар., 2008; Deumens и сар., 2010; Zhang и сар., 2010; Allodi и сар., 2012).

2.6.1. Колаген типа I

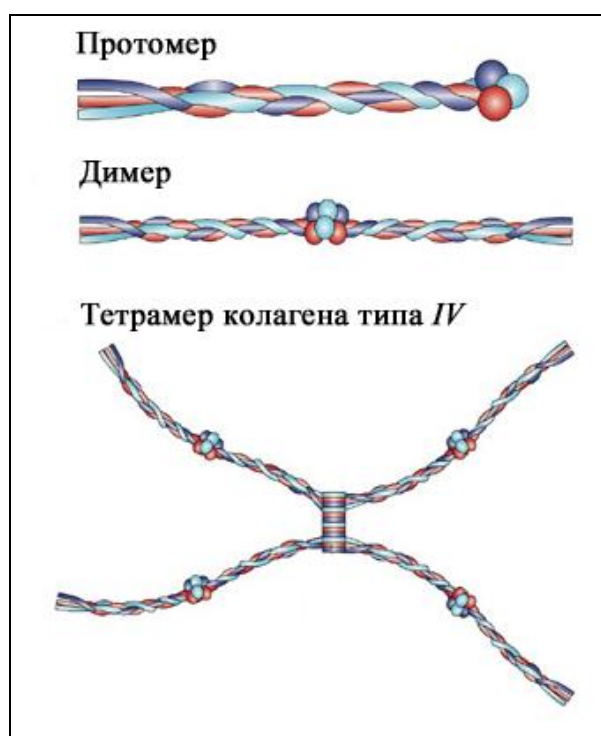
У периферном нервном систему две класе молекула колагена показују експресију: колагени који формирају фибриле и колагени који формирају мреже. У зрелом ПНС колагена влакна се јављају у сва три везивоткивна омотача. Генерално, ове слојеве чине колагени који стварају фибриле: колаген типа I, типа III и типа V. Колаген типа I је најзаступљенији колаген у људском телу. У костима чини више од 90% органске масе и главни је колаген тетива, коже, лигамената, рожњаче и многих других везивних ткива, с изузетком хијалине хрскавице, мозга и стакластог тела ока.

Његов троструки хеликс је обично грађен као хетеротример који се састоји од једног $\alpha 2(I)$ -ланца и два идентична $\alpha 1(I)$ -ланца. Влакна троструког хеликса су *in vivo* уграђена у композите заједно са колагеном типа III (у кожи и ретикуларним влакнима) (Fleischmajer и сар., 1990) или типа V (у костима, тетивима и рожњачи) (Niyibizi и Eyre, 1989). У већини органа, а нарочито у тетивама и фасцијама, колаген типа I пружа затезну чврстоћу, а у костима је битан фактор биомеханичких својстава које се тичу ношења терета, затезне силе и торзионе чврстоће, нарочито након калцификације (Gelse и сар., 2003). У периферном нерву присутан је само у нервним влакнима малог дијаметра која су у контакту са спољашњом површином базалне ламине Шванових ћелија (Osawa и Ide, 1986).

2.6.2. Колаген типа IV

Друга класа колагена која се може наћи у ПНС су колагени базалне мембране. Колаген типа IV је карактеристичан представник ове групе и најбитнији је градивни елемент базалне мембране који учествује у изградњи супрамолекуларних мрежа заједно са ламинином, перлеканом, нидогеном и другим протеинима ЕЦМ (Pöschl и сар., 2004). Идентификовано је 6 типова α - ланаца у колагену типа IV, од $\alpha 1(IV)$ -ланца до $\alpha 6(IV)$ -ланца, који су удружени у три различита хетеротримерна молекула (Слика 2.6.). Преовлађујући облик се састоји од два $\alpha 1(IV)$ -ланца и једног $\alpha 2(IV)$ -ланца који формирају есенцијалну мрежу у већини ембрионских и адултних базалних мембрана (Miner and Sanes, 1994). Друга два хетеротримера чине два $\alpha 5(IV)$ -ланца и један $\alpha 6(IV)$ -ланац, односно три различита ланца – $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$, $\alpha 5(IV)$. У периферном нервном систему базалне мембране које садрже колаген типа IV окружују Шванове ћелије и њима придружене аксоне, и локализоване су испод епителних ћелија. Формирајући

мрежасту структуру изван ламининског слоја колаген типа *IV* даје стабилност базалној мембрани (Kühn, 1995).



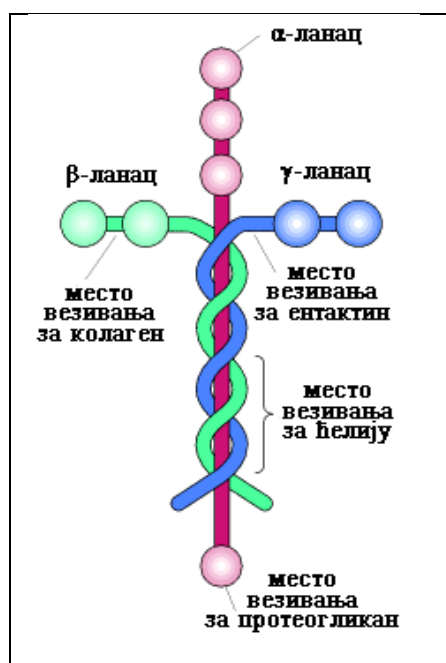
Слика 2.6. Алфа-ланци молекула колагена типа *IV* удружени у протомер, димер и тетрамер (Kalluri, 2003)

Колаген типа *IV* не учествује у организовању стварања базалне мембране. Праћење временског оквира експресије ламинина и колагена типа *IV* у току развоја генетског модела нематод *Caenorhabditis elegans* показало је различите функције ова два типа конституената базалне мембране (Guo и сар., 1991; Guo и Kramer, 1989; Huang и сар., 2003). Нематод *C. elegans* поседује два ламинина, различитих α -субјединица, који се појављују у базалној мембрани у току гаструлације, док до појаве колагена типа *IV* не долази све до ембрионске елонгације. Инхибиција експресије обе ламининске α -субјединице је резултовала губитком базалне мембране и раном смрћу ембриона, што је доказ неопходности постојања ламинина у раним фазама развоја (Huang и сар., 2003). Насупрот овоме, мутације гена за експресију колагена типа *IV* нису спречиле рано стварање базалне мембране, али су у каснијим фазама довеле до смрти ембриона када су започеле мишићне контракције (Guo и сар., 1991; Guo и Kramer, 1989). Повезаност дегенерације колагена с појавом активности указује да је овај тип колагена

потребан базалној мембрани да би могла да се одупре механичком стресу (Yurchenco, 2009).

2.6.3. Ламинин

Ламинин је један од најистраживанијих протеина ЕЦМ, што и проистиче из чињенице да је најприсутнији гликопротеин у базалној мембрани. Нађен је у многим ткивима укључујући ЦНС (Grimpe и сар., 2002), неуромишићни спој (Patton и сар., 2001) и периферне нерве (Doyn и сар., 1993; Patton и сар., 1997). Ово је хетеротримерни протеин који се састоји из пет α -, четири β - и три γ -ланца који могу формирати бар 15 различитих изоформи (Слика 2.7.). Ламинини се спајају у тримере у ендоплазматском ретикулуму преко својих α -хеликсних домена који су додатно ојачани међуланчаним дисулфидним везама (Timpl и Brown, 1994). С растом броја ламининских ланаца и потенцијалних тримера, 2005. године предложена је нова номенклатура за тримере (Aumailley и сар., 2005) по којој се они називају на основу својих конститутивних ланаца. Тако се, на пример, ламинински тример са $\alpha 2$ -, $\beta 2$ - и $\gamma 1$ -ланцем именује као ламинин-221 или скраћено LM-221.



Слика 2.7. Схематски приказ тримера ламинина

(kc.njnu.edu.cn/swxbx/shuangyu/2.htm)

У периферном нерву аксони су појединачно обмотани Швановим ћелијама, а колективно перинеуријумом. Ендонеуријумска базална мембрана покрива спољашњу површину сваког комплекса аксон-Шванова ћелија, док је перинеуријум целом дужином покривен базалном ламином. Код одраслих ендонеуријумска базална мембрана садржи ламининске $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\gamma 1$ -ланце, а понекад се могу наћи и $\alpha 4$ -ланци. У перинеуријуму су у већем проценту присутни $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -ланци. Може се закључити да је у базалној ламини ендонеуријума првенствено присутан LM-211, у перинеуријуму LM-421 и LM-521 (Engvall и сар., 1990; Sanes и сар., 1990; Patton и сар., 1997), док су у ембрионском и раном постнаталном ендонеуријуму откривени високи нивои LM-411 (Patton, 2000).

Базална ламина је први екстрацелуларни матрикс који се појављује у току ембриогенезе, а ламинин је први протеин матрикса који се детектује. Према савременим концептима сматра се да базалне мембране стварају баријере које омогућавају сегрегацију и диференцијацију ембрионских ћелија у специфична ткива. Код одраслих базалне ламине служе као молекуларни филтери у капиларима и гломерулима који спречавају пролаз протеина, а такође и подупиру обликовање нормалног ткива у току раста и регенерације (Martin и Timpl, 1987). Сматра се да ламинин омогућава адхезију ћелија са екстраћелијским матриксом и олакшава процес ћелијске сигнализације, као и да има улогу у расту и спровођењу аксона, мијелинизацији и обезбеђивању средине погодне за регенерацију у ПНС (Luckenbill-Edds, 1997).

Истраживања *in vivo* и на културама показала су да су ламинини у начелу одговорни за организовање склапања базалне мембране на ћелијским површинама. Пречишћени ламинини су једини од компонената базалне мембране способни да склопе ЕЦМ на ћелијским површинама у одсуству осталих компонената (McKee и сар., 2007). Свака базална мембрана садржи ламинин као основну компоненту, тако да генетске мутације које онемогућавају експресију ламинина у специфичном ткиву спречиће стварање базалне мембране у самом том ткиву. У раном ембрионалном развоју, на пример, формирају се две базалне мембране које поседују две изоформе ламинина (LM-111 и LM-511), субвисцерална ендодермална базална мембрана на ембрионској плочи и Рајхертова (Reichert) мембрана. Нокаутом $\beta 1$ - или $\gamma 1$ -ланца искључује се експресија оба ламинина, што за последицу има да ембриони који су у периоду периимплантиције немају развијену базалну мембрану, што води престанку развића и инволуцији (Smyth и сар., 1999; Miner и сар., 2004). За разлику од њих,

нокаут ланаца колагена типа IV, нидогена, перлакана или компензујућих ламининских субјединица није показао суштинске ефекте на стварање базалне мембране све до каснијих фаза ембрионалног развића (*Yurchenco* и сар., 2004). Из наведеног се може закључити да су ламинини кључни у формирању скелета базалних мембрана, док су горе споменути колаген типа IV, нидогени и перлекан задужени за стабилност базалне мембране у току развића (*Poschl* и сар., 2004; *Willem* и сар., 2002).

Базалне мембране се могу наћи на неким, али не и на свим ћелијским површинама. Тако су, рецимо, нађене код Шванових ћелија у развоју, али не и на суседним немијелинизованим аксонима; присутне су у базалном делу епителних ћелија, али не и на суседним фибробластима (*Yurchenco*, 2011). Због тога што се ламинини не скупљају на површини ћелија у одсуству своје α -субјединице, зато што се базалне мембране не формирају у одсуству ламинина и због тога што компоненте могу да дифундују у екстрацелуларни простор, сматра се да је селективна компетентност за формирање базалне ламине регулисана помоћу експресије молекула за везивање ламинина од стране ћелијске површине. Ли и сар. (*Li*, 2005) наводе да су у испитивању на култури Шванових ћелија открили да ова селективност зависи од присуства галактозил-сулфатида, сулфатисаног гликолипида одговорног за везивање ламинина, који постоји на спољашњој површини плазмалеме Шванових ћелија. Фибробласти ембриона, који иначе не формирају базалне мембране, подвргнути су убризгавању сулфатида у плазмалему и потом инкубирани у присуству ламинина, што је довело до склапања базалне ламине.

2.7. Значај компонената ЕЦМ у инжењерингу артифицијалних водича

Периферна нервна регенерација је изазовно научно подручје са релевантном клиничком применом, с обзиром да су данас повреде периферних нерава чешће од повреда кичмене мождине (*Ciardelli* и *Chiono*, 2006; *Evans* и сар., 2002). Повреде нерава, које су примарно трауматске, могу резултовати губитком моторне и сензитивне функције, која генерално води доживотном инвалидитету. Репарација лезија нерава се данас изводи на више различитих начина, али сви они имају заједнички циљ, а то је усмеравање регенеришућих влакана у погодан ендонеуријумски тубус који их води до циљне структуре. Технике нервне репарације се могу поделити у три групе: директна нервна репарација, нервно графтовање и техника репарације водичима (*Siemionow* и

Brzezicki, 2009). Директна нервна репарација се користи у случајевима када је процеп између проксималног и дисталног патрљка нерва мали и два краја се могу прииближити уз минималну тензију (*Diao* и *Vannuyen*, 2000; *Dvali* и *Mackinnon*, 2003). Нервно графтовање се примењује у оним случајевима репарације повређеног нерва када се крајеви не могу прииближити и спојити (коаптација) без тензије (*Siemionow* и *Brzezicki*, 2009). Иако постоји могућност коришћена нервних алогографтова, златни стандард у овим случајевима је примена нервних аутографтова (*Sunderland*, 1945c; *Millesi*, 1990; *Matsuyama* и сар., 2000). Најчешће коришћени нерви за аутографтовање су кожни нерви, и то најчешће сурални нерв (*Ortiguella* и сар., 1987). Нервни аутографтови испуњавају критеријуме идеалног водича регенеришућих аксона с обзиром да подлежу Валеровој дегенерацији, те поред механичке подршке обезбеђују и природну стимулативну средину (скелу, водич) састављену од базалних ламина Шванових ћелија, неуротрофичких фактора и адхезивних молекула. Ова средина је богата екстрацелуларним протеинима попут ламинина и фибронектина (*Chiono* и сар., 2009). Иако аутографтовање представља златни стандард, ова техника репарације повређених нерава има и своје мане. Наиме, постоји губитак сензибилитета у подручју нерва донора, дебљина и фасцикуларна структура нервног графта некада не одговара калибру повређеног нерва (нпр. сурални нерв је знатно тањи, са мањим бројем фасцикулуса у односу на медијанус) и најзад графтовање је лимитирано дужином графта, што представља проблем код вишеструких повреда (*Battiston* и сар., 2005). Постоји могућност коришћења нервних алогографтова, који имају предност у односу на аутографтове, јер се повређени нерв може премостити истим кадаверичним нервом донором, али је највећи недостатак потреба за имуносупресивном терапијом (*Chu* и сар., 2008; *Moradzadeh* и сар., 2008). Трећа могућност у решавању повреда периферних нерава је коришћење водича који могу бити биолошки или артифицијални. Као биолошки водич могу се користити артерије, вене, скелетни мишић или епинеуријумски омотач (*Itoh* и сар., 1996; *Karacaoglu*, 2001; *Battiston* и сар., 2000; *Tang* и сар., 2008). Ова врста водича није често коришћена у клиничкој пракси јер су добри резултати постигнути углавном у случајевима репарације сензитивних дигиталних нерава.

Захваљујући истраживањима на пољу ткивног инжењеринга појавила се могућност коришћења артифицијалних водича (скела, канала). Артифицијални графтови са једне стране имају улогу да повежу нервне патрљке и тиме обезбеде физичко вођење и олакшају неуротрофичку комуникацију. Додатно, унутрашња

пуњења ове врста водича може бити обогаћена разним протеинима и пептидима попут неуронског фактора раста као самим Швановим ћелијама, што додатно усмерава и стимулише раст регенеришућих аксона (*Chiono* и сар., 2009). Идеални артифицијални водич треба да буде биокомпатибилан, довољно механички стабилан до завршетка регенерације, флексибилан, порозан (да би обезбедио снабдевање нутријентима), да се разграђује на нетоксичне продукте и коначно да обезбеди биолошку микрооколину која омогућава ћелијску пролиферацију, миграцију и продукцију компонената ЕЦМ (*Sartori* и сар., 2007, 2008). Артифицијални водичи могу бити састављени од неразградивих материјала, биоразградивих синтетичких материјала и природних полимера (*Chiono* и сар., 2009). Коришћењем неразградивих и биоразградивих синтетских материјала примећено је да често долази до хроничне реакције на страно тело са формирањем већег ожиљка (*Chen* и сар., 2000). Природни полимери имају предности за израду артифицијалних графтова јер су биокомпатибилни, стимулишу ћелијску миграцију без токсичних ефеката. Међутим, релативно брза деградација лимитира њихову употребу. Сходно томе, покушава се са комбинацијом синтетских материјала због бољих механичких могућности и природних полимера попут колагена типа *I*, *III*, *IV*, гелатина, хитосана, силк фиброина и агарозе због њихове биокомпатибилности и стимулативног утицаја (*Yoshii* и сар., 2002; *Chen* и сар., 2000; *Dodla* и *Bellamkonda*, 2006; *Li* и сар., 2007; *Patel* и сар., 2007; *Chiono* и сар., 2008; *Bozkurt* и сар., 2009; *Pertici* и сар., 2014). Данашњи тренд биоинжењеринга усмерен је на коришћење артифицијалних графтова посебно за сваког пацијента. Последњих година покушава се са коришћењем наноматеријала за конструисање графтова (*Chiono* и сар., 2009; *Ding* и сар., 2010).

2.8. Старење периферног нервног система (сенилна неуропатија)

Промене периферног нервног система имају снажан утицај на сигурност и квалитет живота старијих особа. Старење представља општи процес који доводи до слабљења бројних телесних функција. Функционални поремећаји могу бити последица структурних и биохемијских промена које за резултат имају постепени прогресивни губитак неурона и нервних влакана. До компензације не долази због смањене способности нервних влакана за регенерацију и реинервацију код старијих особа. Клиничке студије које указују да је старење удружено са лошијом прогнозом након

повреде нерва данас су подржане и експерименталним студијама које указују да и регенерација повређених нерава и колатерално ницање околних неповређених аксона након повреде нерва опада са старењем (*Verdu* и сар., 2000; *Kovačić* и сар., 2009). Међутим, студије које се баве променама састава екстрацелуларног матрикса ПНС са старењем су ретке.

Симптоми такозване „сенилне неуропатије“ обухватају смањење максималне мишићне снаге, погоршање термалног, тактилног и вибрационог сензибилитета, као и аутономне дисфункције (*Verdu* и сар., 2000; *Peters*, 2002). Погоршање функционалних параметара ПНС са старењем прате и бројне морфолошке алтерације као што су редукција броја и густине мијелинизованих и немијелинизованих влакана (*Verdu* и сар., 2000; *Azcoitia* и сар., 2003; *Jeronimo* и сар., 2008), атрофија великих мијелинских влакана са појавом разних ирегуларности мијелинског омотача (*Melcangi* и сар., 2000; *Peters*, 2002), док је неколико клиничких студија презентовало смањење брзине и степена функционалног опоравка након повреде периферних нерава са старењем (*Ceballos* и сар., 1999; *Verdu* и сар., 2000).

Што се тиче морфолошких промена, аксони старих животиња и људи могу садржати гликогенске инклузије, дегенерисане митохондрије и акумулације филамената (*Pannese*, 2011). Ове промене могу кулминирати код аксонске дегенерације. Опсервирано је да аксони у току или након дегенерације код старијих испитаника (*Pannese*, 2011), и нађено је смањење броја аксона код неколико врста (*Ceballos* и сар., 1999; *Cepurna* и сар., 2005; *Bowley* и сар., 2010; *Peters* и сар., 2010), укључујући људе (*Kawamura* и сар., 1977; *Johnson* и сар., 1987; *Marner* и сар., 2003).

У покушају да се дође до објашњења зашто стари неурони регенеришу мање успешно у односу на млађе помиње се неколико разлога као што су опадање степена преживљавања старих неповређених и повређених неурона, смањење регенеришућег капацитета старих неурона, смањена осетљивост регенеришућих аксона на неуротрофичке факторе као и старосне промене микрооколине регенерисаних аксонских изданака (*Kovačić* и сар., 2009). Неке студије су показале да са старењем долази до пада енергетских потреба периферног живца (*Low* и сар., 1986; *Martinelli* и сар., 2003). Одржавање интегритета неурона на великим растојањима од тела захтева аксонски транспорт који је, пак, зависан од енергетског метаболизма. Сав материјал преношен било антероградно, било ретроградно користи протеинске носаче којима као извор енергије служи аденозин трифосфат (АТФ). Сходно томе, са мањком АТФ долази

и до пада аксонског транспорта, што је и презентовано у неколико студија (*Fernandez и Hodges-Savola*, 1994; *McQuarrie* и сар., 1989).

Мијелински омотач нервних влакана може такође бити погођен старењем. Најчешће промене су сегментална демиелинизација праћена ремиелинизацијом (*Pannese*, 2011), као и разградњом мијелина. Мијелински омотач се може раздвојити дуж главне електроногусте линије, дуж интрапериодичне мање густе линије или дуж обима омотача (*Pannese*, 2011). Будући да мијелин омогућава изолацију аксона и обезбеђује брзо спровођење акционих потенцијала, очекивано је да ће овакве промене довести до смањене брзине спровођења дуж аксона. Штавише, ремиелинизација води ка стварању нових и краћих мијелинских интернодалних сегмената, што додатно успорава спроводљивост (*Pannese*, 2011).

Старосне промене на суралном живцу се јављају у детињству и у старијем животном добу. С обзиром на мању површину ендонеуријума на рођењу, очито је да је густина влакана највећа у то време (*Ouvier* и сар., 1987), мада је и укупан број мијелинизованих влакана суралног живца на рођењу мањи, отприлике износи пола вредности код одрасле особе (*Jacobs и Love*, 1985). Стога су мијелинизована влакна густо пакована, а ендонеуријумски колаген присутан између њих формира компактне снопове с врло мало простора између суседних колагених влакана. Немијелинизована влакна поседују 10 и више аксона. Пречник аксона и дебљина мијелина на рођењу су испод вредности код одрасле особе, али је G-однос изнад нормале, што указује на релативну хипомијелинизацију (*Schroder* и сар., 1978; *Ferriere* и сар., 1985). Са старењем, очито је да долази до раста и раздвајања мијелинизованих влакана (*Jacobs и Love*, 1985; *Schellens* и сар., 1993). Ове су промене најизраженије у току првих неколико година живота. За време овог периода постоји прогресиван раст дебљине мијелинског омотача у односу на дијаметар аксона, мада нека већа влакна могу имати релативно танак мијелински омотач. До пете године пречник аксона достиже вредности код одрасле особе, док је мијелину потребна бар још деценија за достизање адултних вредности. Мидрони и Билбао (*Midroni и Bilbao*, 1995) су предложили узраст од 10 година као груби показатељ доба у коме хумани сурални живац достиже хистолошку зрелост.

Повећање дебљине мијелинског омотача и пречника аксона навршава се у другој деценији живота. У току наредне три-четири деценије количина колагена у ендонеуријума ће благо расти, али с тек местимичним показатељима аксонске дегенерације или демиелинизације (*Jacobs и Love*, 1985). Старосне промене постају

очигледне око 60. године живота, с приметним смањењем дебљине мијелинизованих влакана (*Jacobs и Love, 1985; Tohgi и сар., 1977; O'Sullivan и Swallow, 1968*). Промена је најизраженија на великим мијелинизованим влакнима (*Jacobs и Love, 1985*). У студији на 79 суралних живаца нађен је пад просечне густине великих мијелинизованих влакана за скоро 46% од треће до девете деценије живота (*Tohgi и сар., 1977*). Посматрани фасцикулуси су садржали понеки дегенерисани аксон, као и расута ремиијелинизована влакна и кластере с појавом регенерације. У умереној количини су били присутни и мали и средње велики аксони с несразмерно дебелим мијелинским омотачима. Количина ендонеуријумског колагена је била повећана, а појединачна колагена влакна су била значајно размакнута. Код многих немијелинизованих влакана дошло је до савијања продужетака Шванових ћелија, као и губитка аксона. Након шесте деценије јављала се значајна редупликација ендотелних и перицитних базалних мембрана код *vasa nervorum*, мада саме мембране нису деловале задебљало. Код старијих особа је било присутно задебљање базалних мембрана перинеуријума (*Tohgi и сар., 1977*). Стога промене код ових особа, сем ако су абнормалности очигледне, не могу се сматрати патолошким саме по себи. Код пацијената с минималним променама оне могу бити условљене старењем те је клиничка корелација неопходна.

2.9. Васкуларна неуропатија

Периферна васкуларна болест (ПВБ) и последична периферна неуропатија представљају главне узроке нетрауматских ампутација и инвалидитета у многим земљама (*Reiber и сар., 1995*). Пад физичке способности и губитак независности у извођењу активности у каснијем добу представљају додатне компликације ових стања и указују на њихов шири социјални значај (*Resnik и сар., 2000; van Schie и сар., 2008*).

Раније је било уврежено схватање да се периферна неуропатија развија код дијабетесних пацијената након дугогодишње перзистентне хипергликемије. Данас смо сведоци све више доказа да се код многих особа оболелих од дијабетеса детектује неуропатија у време постављања дијагнозе (*Gregg и сар., 2007*), што указује да идиопатска неуропатија може бити маркер који претходи појави дијабетеса мелитуса типа 2 (*Singleton и сар., 2003; Smith и Singleton, 2006; Smith и сар., 2008*). С обзиром да је неуропатија микроваскуларног карактера, структурна оштећења микроваскулатуре

могу напослетку довести до нервне дисфункције, што и лежи у средишту патогенезе оштећења периферног нерва (Ylitalo, 2011).

Мафсон (Mufson, 1952) је показао да је 37% пацијената од 145 оболелих од ПББ развило неуропатске симптоме у исхемичним доњим екстремитетима. Налаз су најчешће чинили сензитивни симптоми и знаци, али су повремено били присутни и измењени рефлекси и мишићна слабост. Хачинсон (Hutchinson) и Ливерсеџ (Liversedge) су претпоставили да присуство неуропатије директно зависи од тежине ПББ, иако у очи упада податак да су неуролошки поремећаји били благи, упркос узрапредовалој ПББ (Hutchinson и Liversedge, 1956). Највећу учесталост неуропатског дефицита од 88% нашли су Имс и Ланг (Eames и Lange, 1967) у групи од 32 пацијента са тешком исхемијом екстремитета, мада би се поједини неуролошки налази могли приписати старосним променама. Високи постотак (74%) претежно сензитивних знакова неуропатије нашли су и Чопра и Хурвиц (Chopra and Hurwitz, 1969a). Промене нервне спроводљивости и електромијелографских налаза регистроване су код великог броја пацијената с хроничном ПББ и акутном ПББ (Nukada, 1996). Смањена спроводљивост, ниске амплитуде и клинички знаци дисталне денервације су откривени на заједничком перонеалном, задњем тибијалном и суралном нерву.

Функционалне и морфолошке промене на ендотелним ћелијама ендонеуријумских крвних судова код оболелих од ПББ су, разумљиво, од велике важности, с обзиром на њихову улогу у одржавању крвно-нервне баријере, транспорта материја и метаболичких функција. Микрооколина ендонеуријума се одржава независно од опште циркулације захваљујући крвно-нервној баријери, што бива нарушено прекидом интегритета крвно-нервне баријере у исхемичној или хипоксичној неуропатији.

2.10. Дијабетесна неуропатија

Дијабетесна неуропатија је најчешћа неуролошка компликација дијабетеса мелитуса. Више од 80% болесника са дијабетесном неуропатијом развије и дисталну симетричну дијабетесну неуропатију (De Freitas и сар., 1992), која је зависна од дужине нерва, с обзиром да се најраније јавља на дугим аксонима присутним у стопалу, а затим захвата проксималније делове доњих екстремитета и напослетку дисталне делове горњих. Овај вид полинеуропатије се јавља код најмање 50%

дијабетесних пацијената и водећи је узрок ампутације стопала (*Writing Team*, 2002). Једна од највећих хроничних компликација дијабетеса која подразумева дијабетесну неуропатију, ретинопатију и нефропатију јесте дијабетесна микроангиопатија (*Vojtková и сар.*, 2012).

Основни фактор у патогенези дијабетесне неуропатије је недостатак инсулина који изазива стање хроничне хипергликемије која последично доводи до развоја оксидативног стреса. Оксидативни стрес је одговоран за поремећај метаболизма, микро- и макроангиопатију, а збирно ови чиниоци изазвају системска оштећења. Хипергликемија доводи до појаве оксидативног стреса и појачане активности полиолног пута разградње глукозе, повећаног стварања продуката напредне гликације (*advanced glycation products, AGE*), а могуће је и да доприноси дефициту неуротрофичног фактора. Снижен ниво инсулина, пак, изазива поремећај митохондријалне функције, што води смањеној продукцији АТП са консеквентним дефицитом протеина, поремећаја аксоплазматског транспорта и хомеостазе калцијума. Сви наведени фактори утичу на појаву дисталне дегенерације аксона и дијабетесне неуропатије (*Fernyhough и сар.*, 2003). Једном настала хипоксија у ендонеуријуму доводи до појаве зачараног круга са даљим оштећењима капилара, што за последицу има прогресију хипоксије. Томас (*Thomas*, 1991) је показао да степен оклузије капилара корелира са нивоом развијености неуропатије. Микроангиопатија се често може уочити на ендонеуријумским капиларима у виду значајног задебљања базалне мембране (*Johnson и сар.*, 1986). Присуство мултифокалних лезија нерва и промене на ендонеуријумским капиларима указује на значај фактора циркулације у симетричној дијабетесној неуропатији (*Johnson и сар.*, 1986). Регистроване су промене попут аксонске дегенерације, примарне демиелинизације услед дисфункције Шванових ћелија, секундарне сегменталне демиелинизације настале због поремећаја аксонске контроле мијелинизације, затим ремиелинизације, пролиферације Шванових ћелија, атрофије денервисаних трака Шванових ћелија, луковичастих формација и хипертрофије базалне ламине (*Said*, 2007). Ове промене микроциркулације у дијабетесној неуропатији претходе развоју неуропатије и корелирају са степеном њене развијености (*Giannini и Dyck*, 1995), али се њихова улога и везе са самим развојем неуропатије још увек откривају (*McKenzie*, 1999).

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

С обзиром на значајан утицај компонената екстрацелуларног матрикса строме периферног нерва на одржавање оптималне микрооколине за пренос нервних импулса и регенерацију нервних влакана, како током живота тако и након повреде нерва, проистекли су следећи циљеви нашег истраживања:

- извршити анализу старосно условљених разлика у броју, распореду и величини фасцикулуса на хистолошким пресецима суралног нерва,
- анализирати структуру епинеуријума суралног нерва испитаника различите старости,
- извршити квантификацију арее попречног пресека суралног нерва, посебно арее његових фасцикулуса и арее епинеуријума, и пратити њихову динамику са старењем,
- одредити присуство и локализацију колагена типа *I*, *IV* и ламинина у епинеуријуму суралног нерва различите старости,
- извршити структуралну анализу перинеуријумског омотача и анализирати однос дебљине перинеуријума и величине фасцикулуса испитаника различите старости,
- квантификовати однос дебљине перинеуријума и дијаметра фасцикулуса израчунавањем перинеуријумског индекса и регистровати његову динамику са годинама,
- детектовати присуство и локализацију колагена типа *I*, *IV* и ламинина у перинеуријуму суралног нерва различите старости
- квантификовати старошћу условљену динамику колагена типа *I*, *IV* и ламинина у перинеуријуму,
- анализирати структуру ендонеуријума суралног нерва испитаника различите старости,
- одредити волуменску густину мијелинских влакана и ендонеуријумског садржаја те пратити њихову динамику са старењем,
- детектовати присуство и локализацију колагена типа *I*, *IV* и ламинина у ендонеуријуму испитаника различите старости,

- квантификовати промене колагена типа *I*, *IV* и ламинина у ендонеуријуму са старењем,
- извршити морфолошку и морфометријску анализу фасцикуларне структуре и епинеуријума суралног нерва, одредити присуство и локализацију колагена типа *I*, *IV* и ламинина испитаника оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести и компарирати добијене резултате са одговарајућим испитаницима средње и старије контролне групе,
- испитати однос дебљине перинеуријума и величине фасцикулуса суралног нерва, детектовати присуство, локализацију, и извршити квантификацију колагена типа *I*, *IV* и ламинина у перинеуријуму испитаника оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести, и добијене резултате упоредити са истим код испитаника средње и старије контролне групе,
- морфолошки анализирати и квантификовати присуство мијелинских влакана и ендонеуријумског садржаја, спровести испитивање присуства, локализације и квантификације колагена типа *I*, *IV* и ламинина у ендонеуријуму испитаника оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести и добијене резултате анализирати и компарирати са резултатима истих анализа у контролној групи испитаника истих старосних категорија.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

За потребе истраживања као материјал је узиман део стабла суралног нерва са једног доњег екстремитета испитаника оба пола. Узорковање материјала је вршено на 30 кадавера старости 25-88 година након рутинских аутопсија изведених на Институту за судску медицину у Нишу, као и на 30 доњих екстремитета особа старости од 45 до 88 година, добијена након потколених и натколених ампутација обављених на Клиници за васкуларну хирургију Клиничког центра у Нишу. За извођење овог истраживања добијено је одобрење Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Кадаверично ткиво живца које је коришћено за истраживање старосних промена потицало је само од кадавера код којих је, на основу медицинске документације и хетероанамнестичких података, потврђено да за живота није дијагностикован дијабетес мелитус или периферна васкуларна болест. Узорак живца је узиман унутар 12 сати од смрти.

Ткиво суралног живца са ампутираних делова доњег екстремитета је узето од особа код којих је претходно дијагностикован: 1) дијабетес мелитус тип 2 са дуготрајном историјом болести (у трајању 8-20 година), или 2) периферна васкуларна болест хроничног карактера с постојањем улцерозних и некротичних промена на потколеници, болова у ногама и историјом реконструкција крвних судова, без присуства дијабетеса мелитуса. Узорковање живца је вршено одмах по извршеној ампутацији. Сви узети узорци су након дисекције били фиксирани у 10% пуферисаном формалину на 24-48 сати.

Ткивни узорци са кадаверичног материјала били су подељени по старости у три групе: *I* (25-44 године) просечне старости $36,62 \pm 6,16$ година, *II* (45-64 године) просечне старости $56,33 \pm 6,25$ година, и *III* (65-88 година) просечне старости $76,13 \pm 5,04$ године. Узорци са ампутационог материјала су на основу дијагностикованог обољења прво разврстани у две групе: групу испитаника оболелих од дијабетеса мелитуса и групу испитаника оболелих од периферне васкуларне болести. Потом је свака група испитаника подељена на две старосне групе (45 до 64 године просечне старости $60 \pm 3,1$ година за оболеле од дијабетеса, односно $57,33 \pm 4,62$ за оболеле од ПVB, и друга група

од 65 до 88 година просечне старости $77 \pm 4,73$ године у групи са дијабетесом, односно $77 \pm 6,1$ година код пацијената са ПВБ). Њихова просечна старост није се сигнификантно разликовала у односу на случајеве *II* и *III* контролне старосне групе.

4.2. Методе

Ради остваривања циљева истраживања у раду су коришћене следеће методе: анатомска микродисекција, хистолошка обрада ткива, хистохемијске и имунохистохемијске методе, дескриптивна морфолошка метода и морфометријске анализе. Вредност добијених података је напослетку проверена статистичким анализама.

4.2.1. Анатомска микродисекција

Поступак за извођење микродисекције доњих екстремитета ради узорковања суралног живца за потребе хистолошке обраде био је следећи: направљен је вертикални рез дужине 5 *cm* на средини растојања између спољашњег малеолуса и Ахилове тетиве, потом је препарацијом размакнута кожа и поткожно ткиво у коме се налази мала сафенска вена испод које је идентификован сурални живац од чијег је стабла узет узорак дужине 3 *cm*, који је потом фиксиран у формалину.

4.2.2. Хистолошка обрада ткива

Након фиксације, ткивни материјал суралних живаца прво је подвргнут рутинској, аутоматизованој обради до парафинских калупа, уз употребу дехидратационе линије усходних концентрација етанола, просветљавања ксилолом и инфилтрације полимерним парафинским воском на Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Од сваког испитиваног случаја узет је у даљу обраду један калуп парафинизованих ткивних узорака најрепрезентативније микроскопске слике за одређену испитивану групу.

4.2.3. Хистохемијске методе

Од изабраних калупа микротомом су начињени ткивни пресеци, дебљине 5 микрометара, и адхерирани на предметна стакла за потребе бојења модификованом трихромном методом по Масону (*Masson*). Ткивни пресеци су затим подвргнути процесу депарафинације, најпре у термостату на 64° Целзијусова у току једног сата, а затим и у ксилолу у трајању од 15 минута. Након тога ткивни исечци су рехидрирани употребом нисходних концентрација етанола (100%, 96%, 75%) и преливени дестилованом водом. Ткивни пресеци су два минута бојени алдехид фуксином, који је затим испран 75% алкохолом, а потом дестилованом водом. Након тога ткивни пресеци су бојени 1 минут у Мајеровом (*Mayer*) хематоксилину, а затим диферентовани у чесменој води (до 2 минута) и испрани у дестилованој води. У следећем кораку на ткивне исечке је нанесен 0,5% кисели фуксин (до 1 минута), испран дестилованом водом, а затим је боја диферентована у хетерополикиселинама (водени раствор једнаких запремина 2,5% фосфоволфрамске и фосфомолибденске киселине - до 10 минута), исечци су испрани 0,5% сирћетном киселином (2-5 минута) и испрани дестилованом водом. Након тога на ткивне исечке је нанесен лихт грин (око 5 минута), који је потом испран дестилованом водом. Ткивни исечци су затим дехидрирани кроз серије етанола са растућом концентрацијом (96%, 100%), просветљени у ксилолу и монтирани коришћењем канада балзама и покровних љуспица.

4.2.4. Имунохистохемијске методе

За имунохистохемијску анализу коришћено је ткиво хуманог суралног нерва са 30 кадавера и са 24 ампутирана доња екстремитета. Након депарафинације у термостату и ксилолу, хистолошки препарати су рехидратисани провођењем кроз етанол са опадајућим концентрацијама (100%, 96%) и доведени су до дестиловане воде. Процедура бојења је настављена инкубацијом ткивних узорака са трипсином у циљу демаскирања антигена током 90 минута, након чега је извршена блокада ткивних пероксидаза коришћењем 3% раствора водоник пероксида у трајању од 10 минута. Након испирања у фосфатном пуферу, на ткивне исечке нанета су примарна антитела за маркирање ткивних антигена: антитело на колаген I (зечје поликлонално антитело, произвођач: *Abcam*, каталошки број *ab34710*, разблажење 1:400), антитело на колаген IV (зечје поликлонално антитело, произвођач: *Abcam*, каталошки број *ab6586*,

разблажење 1:400) и антители на ламинин (зечије поликлонално антители, произвођач: *Abcam*, каталошки број: *ab11575*, разблажење 1:25). Парафинизовани ткивни исечци суралних нерава су остављени преко ноћи на температури од 4° Целзијуса и бојење је настављено током сутрашњег дана применом секундарног антитета конјугованог пероксидазом рена 30 минута (*HRP/DAB*, произвођач *Abcam*, каталошки број: *ab64261*). Између наведених корака, препарати су испирани фосфатним пуфером ($pH=7,1$). Као хромоген коришћен је диаминобензидин (*DAB*), након чега су препарати дехидратисани кроз серију етанола са растућом концентрацијом (96%, 100%), просветљени у ксилолу и монтирани коришћењем канада балзама и покровних лъуспица.

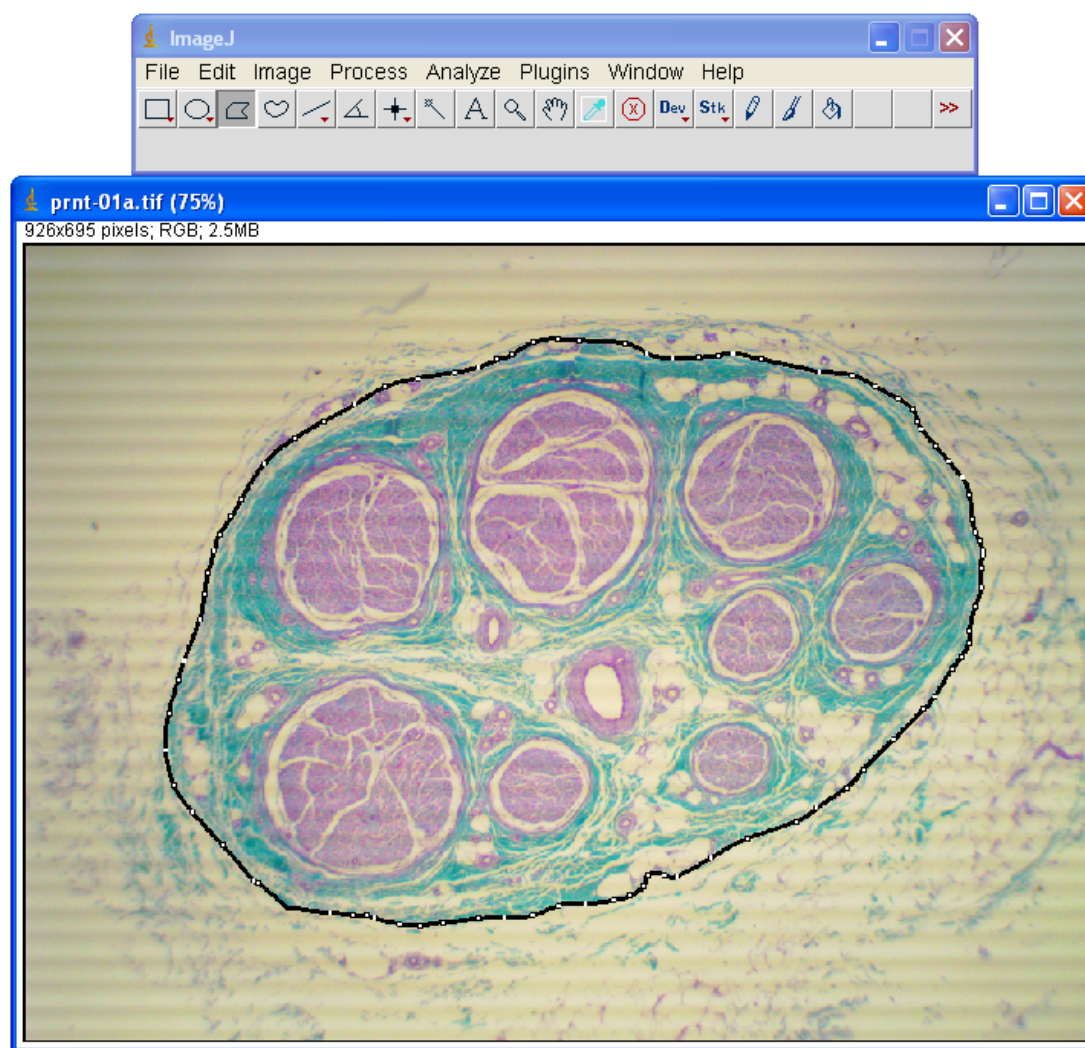
4.2.5. Дескриптивна морфолошка метода

Микроскопски препарати попречног пресека суралног нерва анализирани су на светлосном микроскопу са дигиталном камером марке *Olympus C011 (Olympus)* Института за анатомију Медицинског факултета Универзитета у Нишу при увећању 40×, 100×, и уз помоћ објектива за уљану имерзију на увећању од 1000×. Уз помоћ камере, монтиране преко адаптера на окулар микроскопа, начињене су фотографије хистолошких пресека свих испитиваних нерава. Употребом трихромног бојења сагледане су основни структурни елементи периферног нерва: фасцикуларна грађа периферног нерва, морфолошке особине, грађа, дебљина и садржај везивноткивних омотача нерва (епинеуријума, перинеуријума и ендонеуријума).

4.2.6. Морфометријске анализе

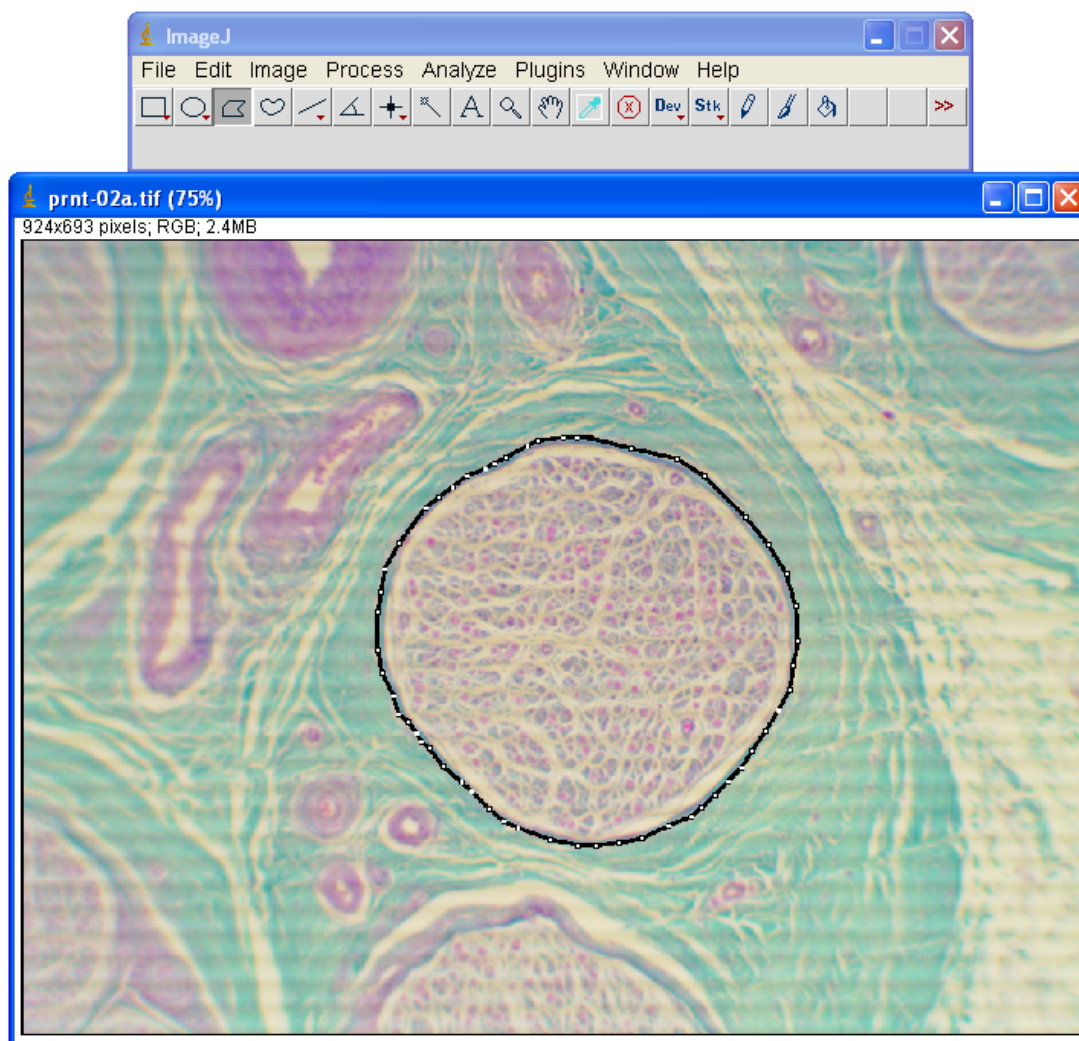
Морфометријска анализа обављена је уз коришћење програма Имиџ Џеј (*ImageJ*) верзија 1.44p (*National Institute for Health*; <http://imagej.nih.gov/ij/>). На увећању 40× обухватило је следеће карактеристике: укупан број фасцикулуса, ареу целог суралног нерва и ареу епинеуријума. На увећању 100× као индиректни параметар за анализу епинеуријума мерена је укупна фасцикуларна ареа, док је перинеуријумски индекс анализиран за процену стања перинеуријума. Волуменска густина мијелинизованих аксона и волуменска густина ендонеуријумског садржаја као фактор промена у ендонеуријуму сагледане су на увећању од 1000×.

Ареа целог суралног нерва анализирана је на увећању $40\times$. Пре почетка мерења извршена је калибрација програма уз помоћ објектног микрометра (1:100). Дигитална слика објектног микрометра на одговарајућем увећању и резолуцији послужила је за мерење дистанције од $10\ \mu\text{m}$ на основу које је израчунат број пиксела по микрометру. Потом је одабрана опција *Analyze/Set Scale* где смо измереној дистанцији у пикселима додали познату дужину. Након калибрације слике уз помоћ опције *Analyze/Set Scale* изабрана је полигонална селекција којом је тачкама повезаним изломљеном линијом окружен испитивани пресек нерва (Слика 4.1.). Површина датог пресека је измерена одабиром опције *Analyze/Set Measurements*, а затим означавањем опције *Area* и кликом на *Measure*, при чему је добијена ареа обележене површине у јединицама калибрације (μm^2).



Слика 4.1. Обележавање арее попречног пресека целог нерва полигоналном селекцијом

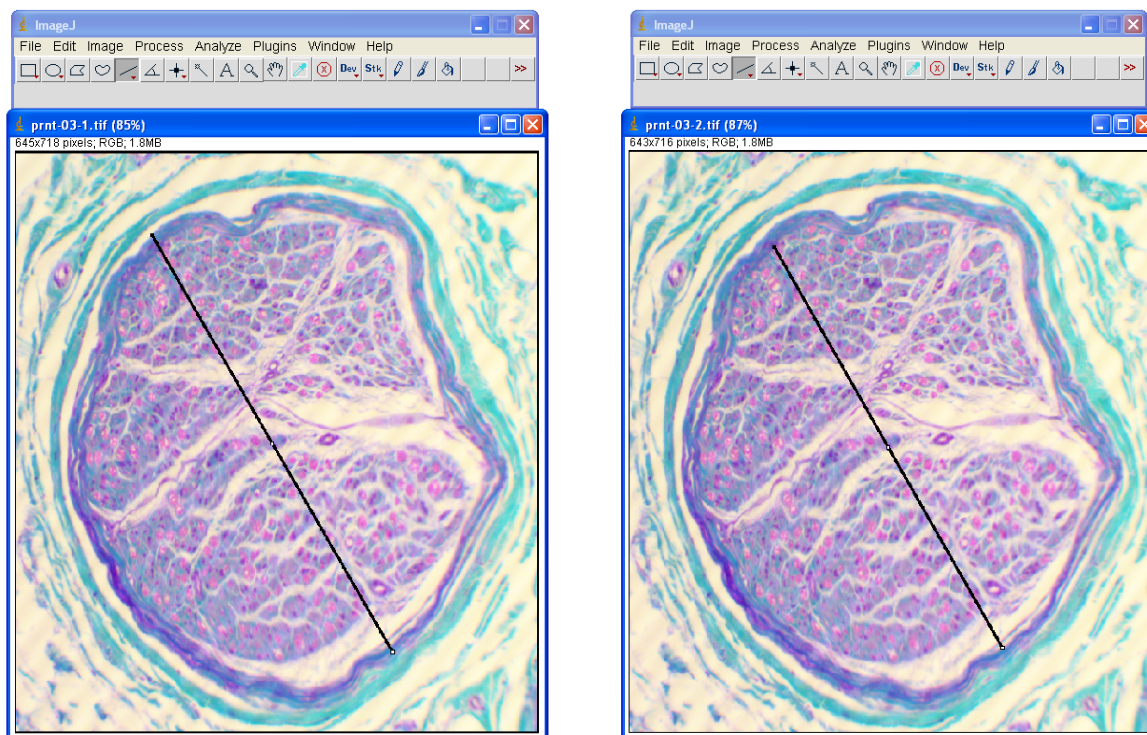
Ареа епинеуријумског омотача сваког случаја добијена је као разлика укупне арее нерва и укупне фасцикуларне арее. На увећању $100\times$ начињене су фотографије свих фасцикулуса испитиваног пресека нерва. Пре сваког мерења поново је извршена калибрација програма. Метода мерења арее сваког фасцикулуса појединачно аналогна је оној за ареу целог нерва (Слика 4.2.). Укупна фасцикуларна ареа нерва сваког испитиваног случаја добијена је као збир ареа појединачних фасцикулуса (μm^2).



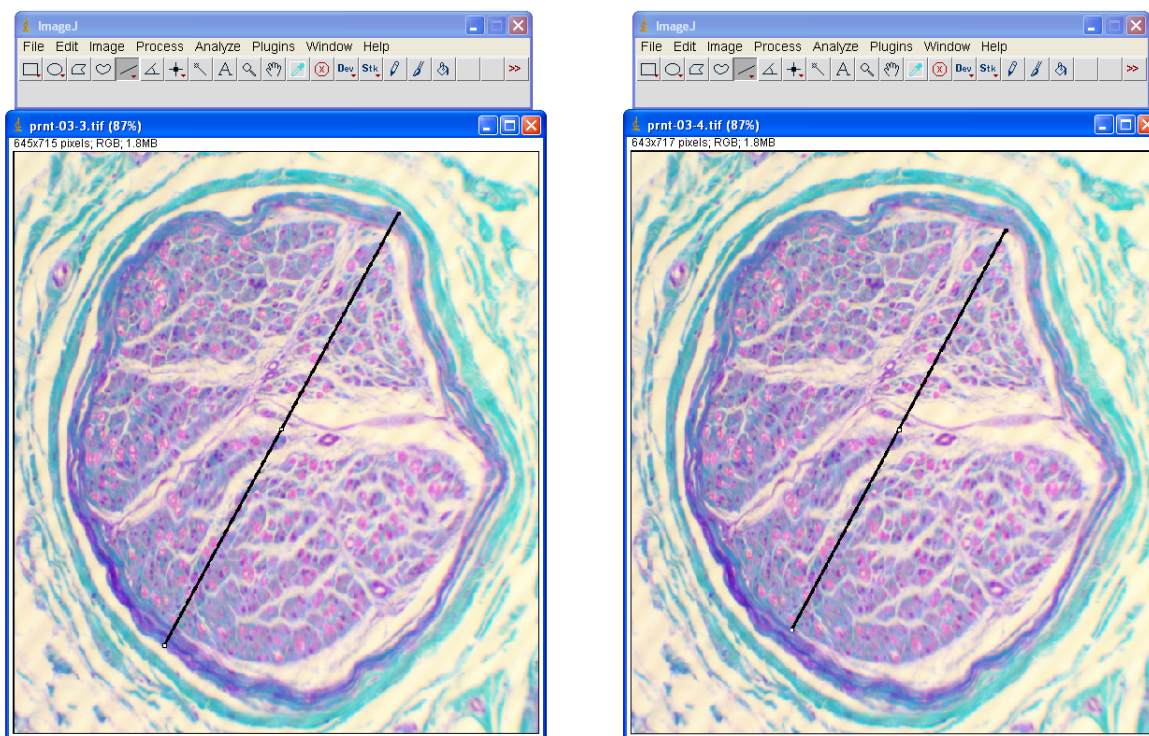
Слика 4.2. Обележавање површине фасцикулуса полигоналном селекцијом

С обзиром да је дебљина перинеуријумског омотача директно зависна од величине фасцикулуса (већи фасцикулуси имају дебљи перинеуријумски омотач), за анализу промена дебљине овог омотача нерва коришћен је перинеуријумски индекс. Он је израчунаван по формули: $P\ index = (1 - D_I/D_O) \times 100$ која је у датом облику

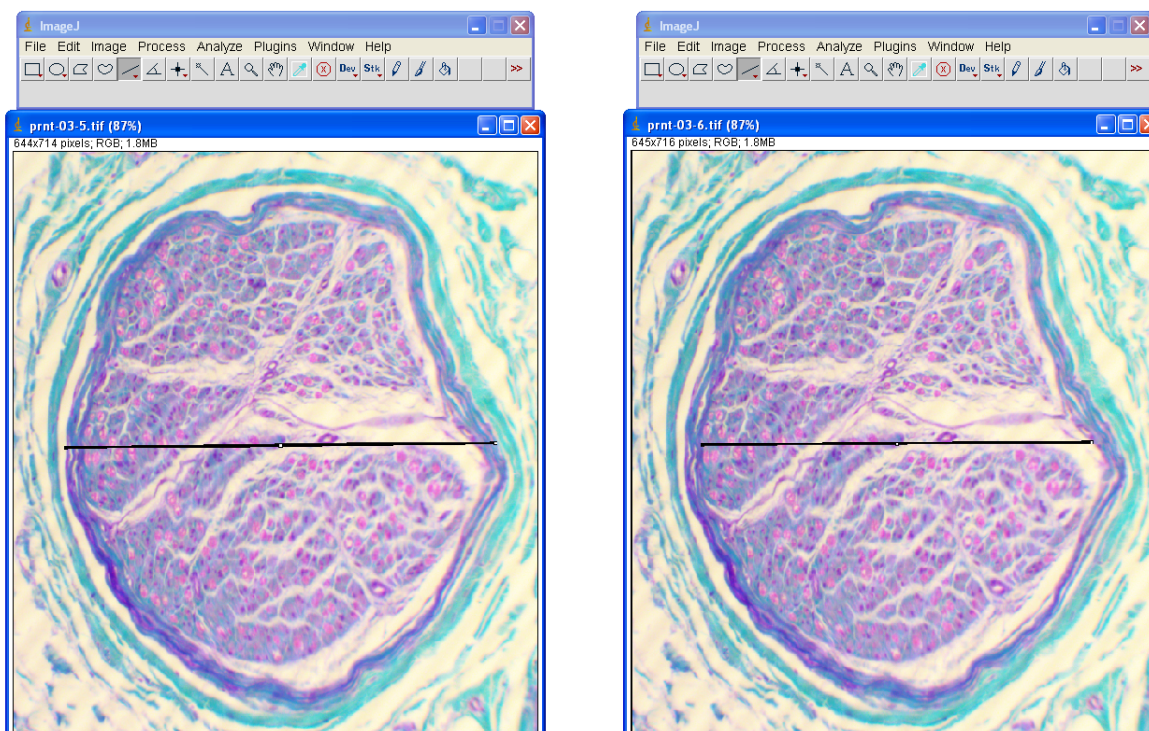
модификована у односу на предложену у литератури (Tohgi и сар., 1977). Индекс заправо представља однос спољашњег (*outer*) дијаметра фасцикулуса (дистанције мерене између две најудаљеније тачке на супротним странама спољашњег слоја перинеуријума која пролази кроз центар фасцикулуса - D_o) и унутрашњег (*inner*) дијаметра (растојања међу двама супротстављеним тачкама с унутрашњег слоја перинеуријума које пролази кроз средиште фасцикулуса - D_i). За мерење описаних дијаметара коришћене су фотографије сваког фасцикулуса посебно, на увећању $100\times$. Пре мерења извршена је калибрација програма. Спољашњи и унутрашњи дијаметар за сваки фасцикулус мерени су на три места (попречни, леви и десни коси дијаметар) уз помоћ опције „*straight line*“, а кликом на *Measure* добијена је вредност за дужину линије у јединицама калибрације (μm), након чега је добијена просечна вредност P индекса за сваки фасцикулус (Слика 4.3, 4.4, 4.5.). Из просечних вредности P индекса фасцикулуса добијена је просечна вредност P индекса за сваки испитивани узорак нерва.



Слика 4.3. Мерење спољашњег и унутрашњег левог косог пречника фасцикулуса

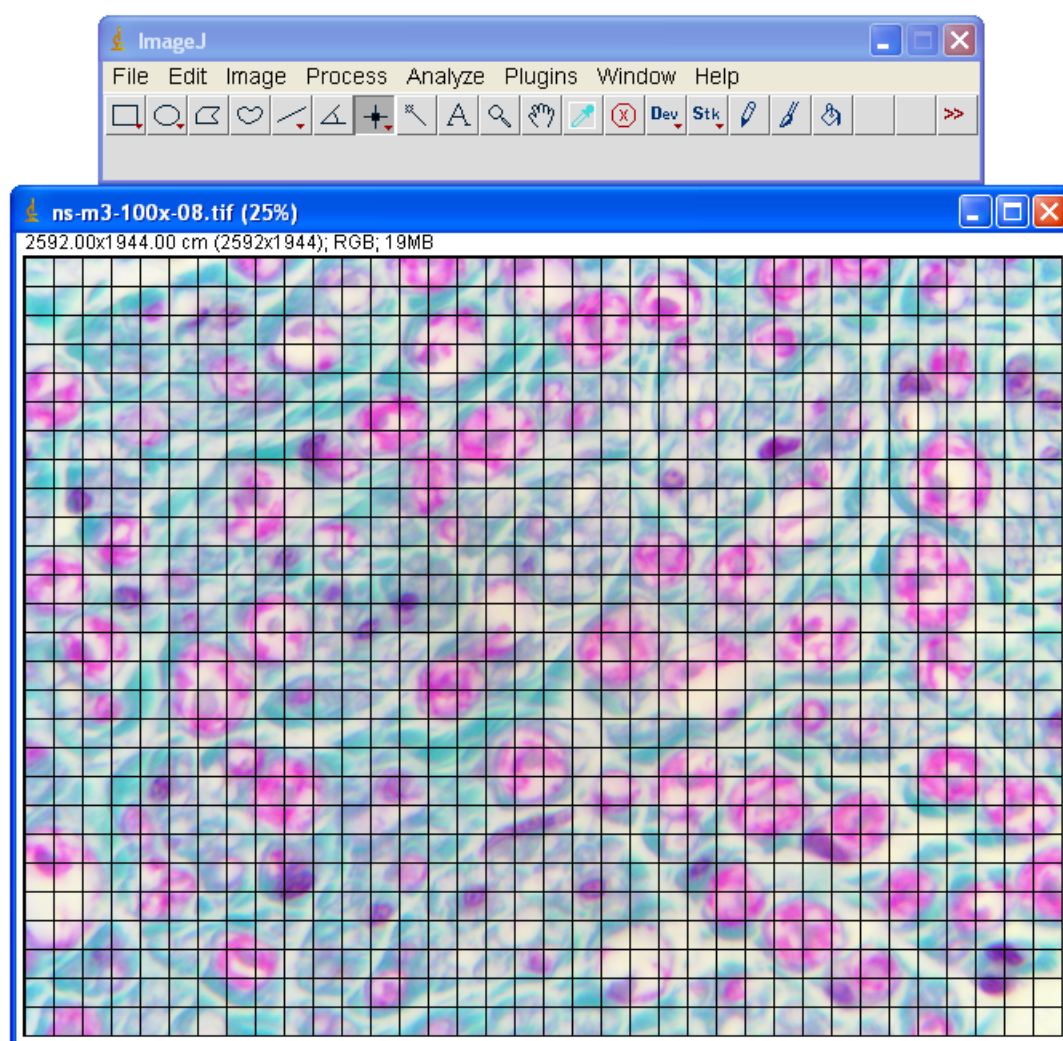


Слика 4.4. Мерење спољашњег и унутрашњег десног косог пречника фасцикулуса



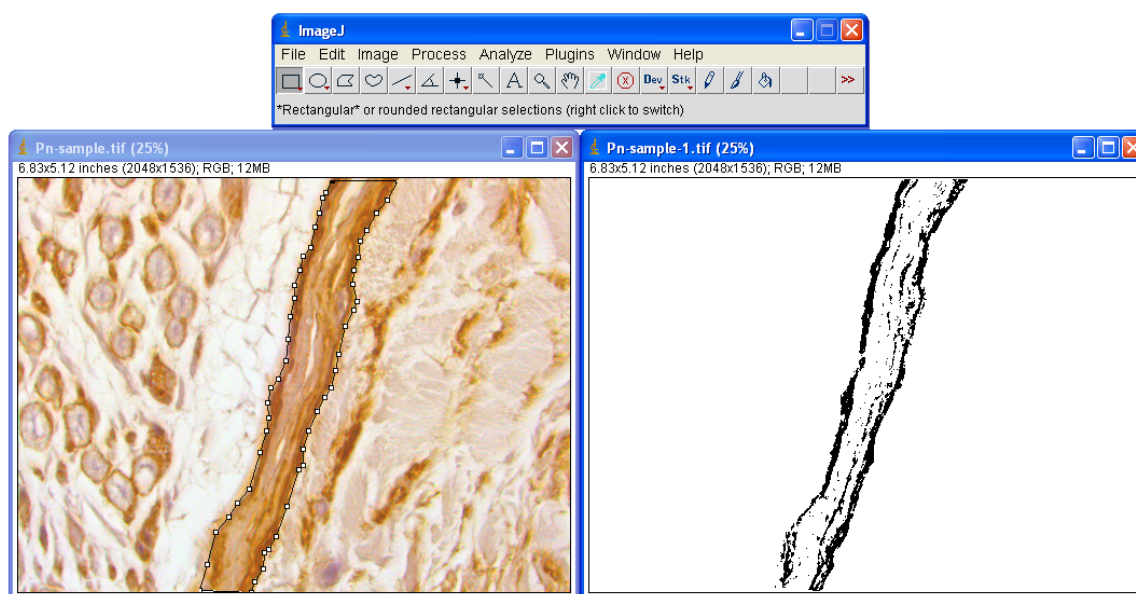
Слика 4.5. Мерење спољашњег и унутрашњег попречног пречника фасцикулуса

Волуменска густина мијелинизованих аксона (V_{Vma}) и волуменска густина ендонеуријумског садржаја (V_{Ven}) анализирана је за сваки испитивани случај, тако што је сликано 10 насумично изабраних видних поља унутар фасцикулуса на увећању $1000\times$. Употребом додатка *Grid Overlay* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/graphic-overlay.html>) постављена је мрежица тестног система преко фотографије. Карактеристике тестног система су биле следеће: укупан број тестних тачака $P_t=972$, површина тестног система $A_t=8748 \mu m^2$ и растојање између две суседне тестне тачке $d=3 \mu m$. Уз помоћ додатка „*Cell counter*“ бројане су тачке које падају на мијелинизована влакна (аксон и мијелински омотач) и ендонеуријумски садржај (Слика 4.6.). Волуменска густина испитиваних параметара (V_{Vma} и V_{Ven}) израчуната је по формули $V_{Vf} = P_f/P_t$ где је V_{Vf} волуменска густина испитиване фазе, P_f број тачака које падају на испитивану фазу, а P_t укупан број тестних тачака (*Kališnik*, 1985).



Слика 4.6. Мрежица тестног система за мерење волуменске густине

Имунохистохемијска анализа присуства и дистрибуције колагена типа *IV*, типа *I* и ламинина обухватила је дескриптивну морфолошку анализу и морфометријске методе. Експресија ова три елемента ЕЦМ у епинеуријумском омотачу суралног нерва сагледана је дескриптивном анализом, док је анализа перинеуријума и ендонеуријума била дескриптивна и морфометријска.

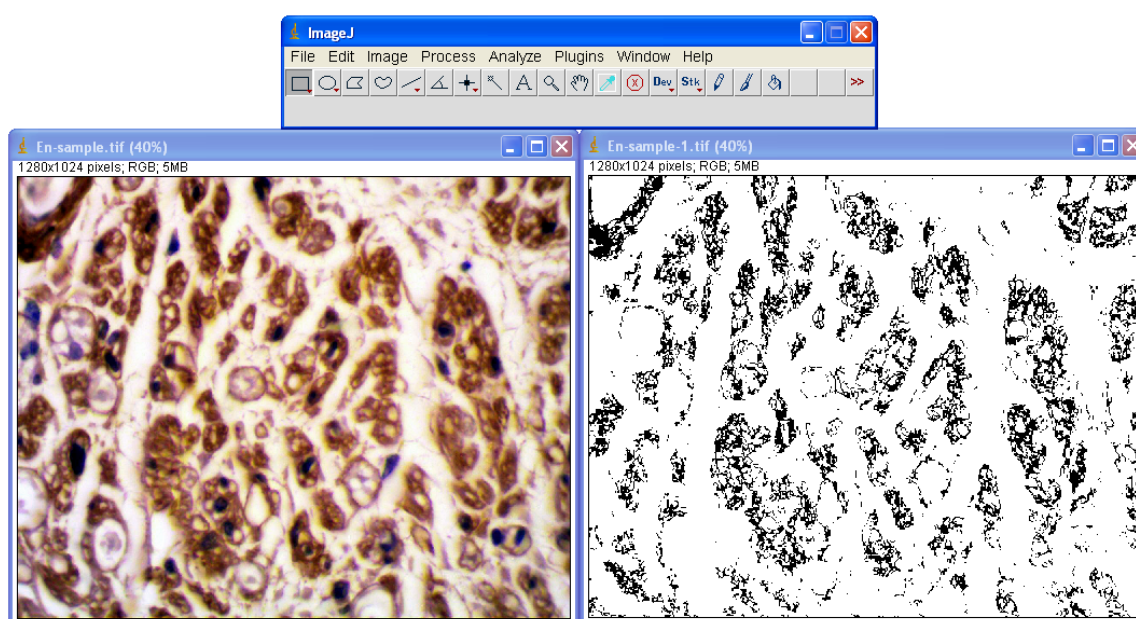


Слика 4.7. Узорковање позитивних пиксела у перинеуријумском омотачу

За морфометријску анализу експресије колагена типа *IV*, типа *I* и ламинина у перинеуријуму сликано је 10 насумично изабраних видних поља за сваки испитивани случај, која су обухватала део овог омотача на увећању 1000 $\times$. Након калибрације слике у програму „Имиџ Џеј“ полигоналном селекцијом је означен видљиви део перинеуријума. Опцијом *Edit/Clear Outside* уклоњен је остатак слике, а затим је површина означеног дела измерена одабиром опције *Analyze/Set Measurements*, а затим означавањем опције *Area* и кликом на *Measure*, при чему је добијена ареа у јединицама калибрације (μm^2). Након тога је на најмање пет места узоркована браон боја интензитета који одговара позитивној експресији датог протеина. Активиран је плагин *Image/Adjust/Color Threshold*, док је чекирана опција *Black and White (B&W)*, чиме су обележени као црни сви пиксели који одговарају прагу датог интензитета боје, док је остатак слике био бео. Слика је потом претворена у бинарни облик (*Process/Binary/Make Binary*) и одабиром опције *Area Fraction* под *Analyze/Set Measurements* измерена је црно обележена површина која одговара позитивним

пикселима, што би одговарало волуменској густини испитиваног маркера (колагена типа IV, типа I и ламинина) у перинеуријуму (Слика 4.7.).

За анализу експресије колагена типа IV, типа I и ламинина у ендонеуријуму, сликано је 10 насумично изабраних видних поља унутар фасцикулуса на увећању 1000×. Потом су на минимум пет места узорковани позитивни браон пиксели и даља процедура обраде слике идентична је претходно описаној код перинеуријума (Слика 4.8.). Добијени резултати су представљени као волуменска густина одговарајућег маркера (колагена типа IV, типа I и ламинина) у ендонеуријуму сваког испитиваног случаја.



Слика 4.8. Узорковање позитивних пиксела у ендонеуријуму

4.2.7. Статистичке методе

Статистичка анализа добијених вредности морфометријских параметара извршена је уз помоћ програма *IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp.)*. Сви параметри су израчунати за сваки појединачни случај у одређеној групи, а затим је одређена просечна вредност и стандардна девијација. Разлике испитиваних параметара између старосних група су тестиране помоћу униваријантног АНОВА теста. Веза између добијених параметара везивоткивних омотача суралног нерва и старости испитиваних случајева тестирана је помоћу коефицијента линеарне корелације. За анализу добијених параметара између контролне групе и испитаника оболелих од дијабетеса

мелитуса и периферне васкуларне болести исте старосне групе коришћен је t -тест за два независна узорка.

Квантитативни параметри су приказани у табелама и графиконима урађеним у компјутерском програму *Microsoft Office Excel 2007*.

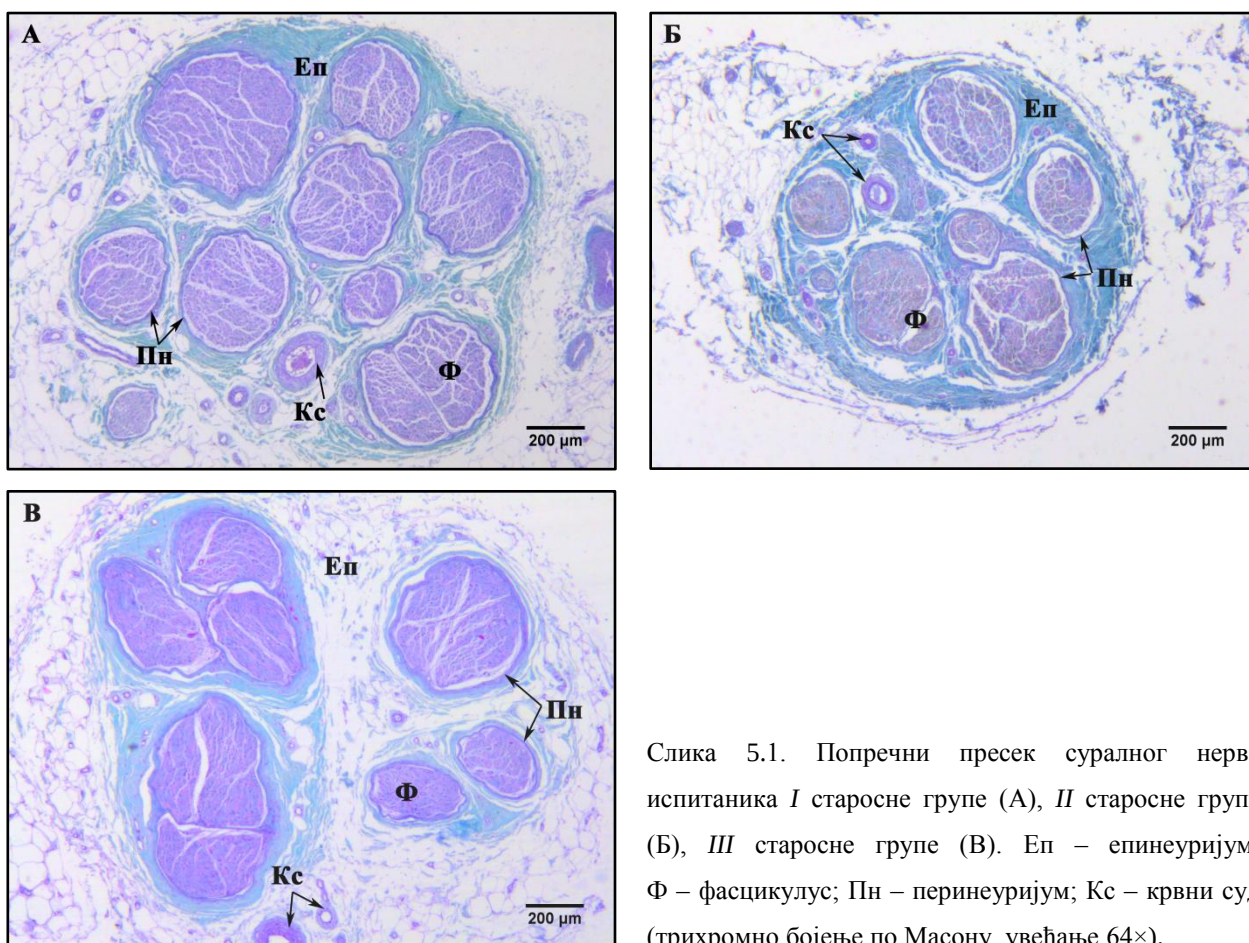
5. РЕЗУЛТАТИ

Анализом узорака суралних нерава установљено је присуство свих елемената хистолошке грађе периферног нерва. Код свих испитиваних узорака присутан је већи број фасцикулуса, јасно дефинисан ламеларни перинеуријумски омотач који их окружује, као и интер- и епифасцикуларни део епинеуријумског везивног омотача.

5.1. Морфолошка и морфометријска анализа епинеуријумског омотача

5.1.1. Фасцикуларна организација и морфолошке карактеристике епинеуријумског омотача суралног нерва са старењем

На попречном пресеку суралних нерава свих испитиваних узорака уочавају се елементи суралног нерва, при чему се број фасцикулуса по групама креће од 3 до 15. Фасцикулуси су у најмлађој испитиваној групи правилног кружног или елипсоидног облика. У појединим фасцикулусима се уочавају знаци преграђивања, у различитим фазама развоја, што се може закључити на основу дебљине, хистолошке композиције везивноткивне преграде, као и количине колагена у односу на околни перинеуријум. У средњој старосној групи у појединим нервима, код старијих испитаника, могу се уочити почетни знаци смањења дијаметра фасцикулуса, што је случај и у најстаријој старосној групи. Интер- и епифасцикуларни део епинеуријумског омотача испитиваних узорака је добро развијен, при чему се запажа да уз перинеуријум има згуснутију, ламеларну грађу. Између фасцикулуса епинеуријума уочавају се издужена хетерохроматична једра фиброцита. Са старењем се не запажају промене у количини и изгледу интер и епифасцикуларног дела епинеуријумског везивног омотача. У епинеуријуму суралног нерва присутни су велики и мали крвни судови, артеријског и венског типа, при чему је у појединим живцима средње и најстарије групе уочено задебљање интима, уз нормалну морфологију тунике медије. Око крвних судова епинеуријум такође показује ламеларну грађу. Поред крвних судова присутни су и унилокуларни адипоцити, појединачни или у групама. Стиче се утисак да је бројност адипоцита већа код испитаника најстарије групе (Слика 5.1.).



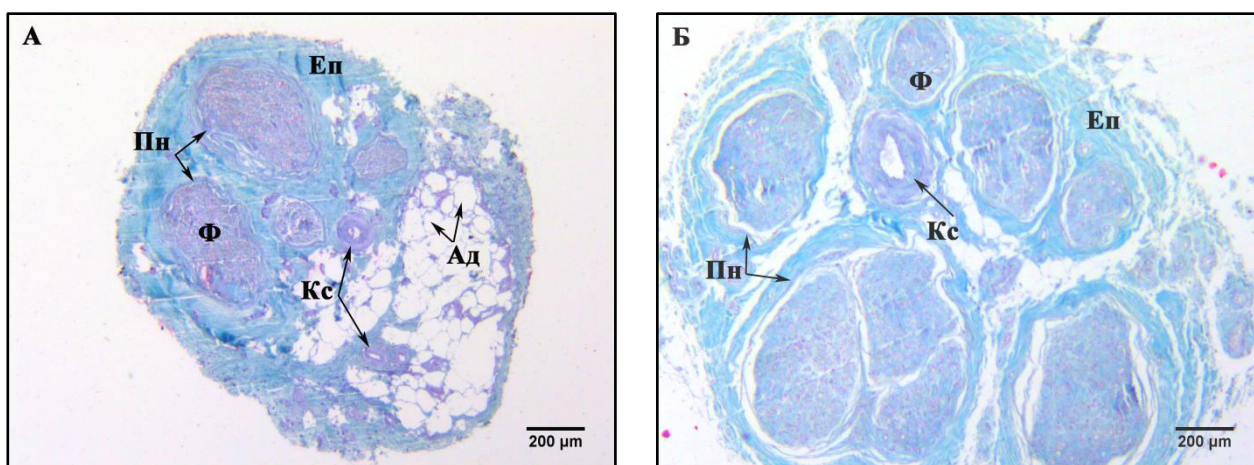
Слика 5.1. Попречни пресек суралног нерва испитаника I старосне групе (А), II старосне групе (Б), III старосне групе (В). Еп – епинеуријум; Ф – фасцикулус; Пн – перинеуријум; Кс – крвни суд (трихромно бојење по Масону, увећање 64×).

5.1.2. Фасцикуларна организација и морфолошке карактеристике епинеуријумског омотача суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

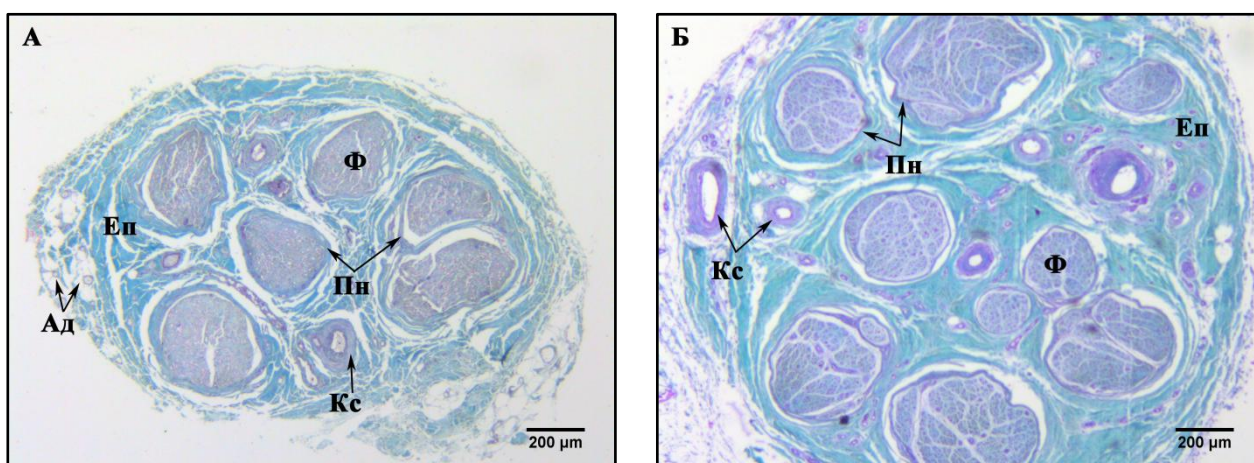
На пресецима суралног нерва пацијената оболелих од дијабетеса уочава се мултифасцикуларна грађа при чему се број фасцикулуса кретао од 3 до 18. Фасцикулуси су овалног или елипсоидног облика, са знацима тенденције смањења пречника. Епинеуријум суралног нерва испитаника са дијабетесом је добро изражен, компактног изгледа непосредно уз перинеуријум фасцикулуса, са видљивим једрима фиброцита и местимично присутним крвним судовима (Слика 5.2.). У односу на испитанике контролне групе не уочава се разлика у количини и распореду епинеуријумског везивног омотача. У епинеуријуму се уочавају већи крвни судови нормалне морфологије, као и крвни судови са задебљањем интима и хијалинизацијом тунике медије артерија, при чему су ове промене израженије у старијој групи

дијабетичара. Такође, на највећем броју пресека нерва, присутни су унилокуларни адипоцити који могу бити појединачни или формирати мање или веће групе.

Сви узети сурални живци групе испитаника са периферном васкуларном болести били су мултифасцикуларни, при чему се број фасцикулуса кретао од 7 до 10, Фасцикулуси су округлог до елипсоидног облика, различите величине. Код старијих испитаника епинеуријум је гушћи и организованији, стиче се утисак већег садржаја, а могу се запазити и већи субендотелни депозити у артеријским крвним судовима (Слика 5.3).



Слика 5.2. Попречни пресек суралног нерва испитаника са дијабетесом мелитусом старосне групе: 45-64 године (А) и 65-88 година (Б). Еп – епинеуријум; Ф – фасцикулус; Пн – перинеуријум; Кс – крвни суд; Ад – адипоцит (трихромно бојење по Масону, увећање 64×).



Слика 5.3. Попречни пресек суралног нерва испитаника са ПVB старосне групе: 45-64 године (А) и 65-88 година (Б). Еп – епинеуријум; Ф – фасцикулус; Пн – перинеуријум; Кс – крвни суд; Ад – адипоцит (трихромно бојење по Масону, увећање 64×).

5.1.3. Морфометријска анализа фасцикуларне структуре и епинеуријумског омотача суралног нерва са старењем

У Табели 1 приказане су просечне вредности броја фасцикулуса, арее целог суралног нерва (A_{sn}), арее епинеуријума (A_{ep}) и укупне фасцикуларне арее (A_f) испитиваних нерава. У најмлађој групи испитаника просечан број фасцикулуса је износио $7,89 \pm 2,37$. Пад броја фасцикулуса је забележен у средњој старосној групи и износио је $6,83 \pm 1,72$, док је пораст на $8,20 \pm 3,07$ забележен у најстаријој групи. Ове промене у односу на најмлађу групу нису показале статистичку значајност. Просечна ареа суралног нерва износила је $2,023 \pm 0,559 \text{ mm}^2$ у *I* старосној групи, $1,959 \pm 0,664 \text{ mm}^2$ у *II* старосној групи и $2,120 \pm 0,542 \text{ mm}^2$ у *III* старосној групи. Просечна површина епинеуријумског омотача износила је $1,308 \pm 0,421 \text{ mm}^2$ у најмлађој групи, са растом у средњој ($1,381 \pm 0,526 \text{ mm}^2$) и најстаријој старосној групи ($1,476 \pm 0,438 \text{ mm}^2$) без статистичке значајности. Укупна фасцикуларна ареа је износила $0,715 \pm 0,304$ у *I* старосној групи, са падом на $0,578 \pm 0,207 \text{ mm}^2$ у *II* старосној групи, док је у *III* старосној групи показала раст на $0,644 \pm 0,254 \text{ mm}^2$ (Табела 1), такође без значајности

Табела 1. Просечне вредности броја фасцикулуса, арее целог суралног нерва, арее епинеуријума и укупне фасцикуларне арее суралног нерва са старењем

Старосна група	N	Број фасцикулуса	Ареа целог суралног нерва (A_{sn}) (mm^2)	Ареа епинеуријума (A_{ep}) (mm^2)	Укупна фасцикуларна ареа (A_f) (mm^2)
<i>I</i> (25-44 год.)	9	$7,89 \pm 2,37$	$2,023 \pm 0,559$	$1,308 \pm 0,421$	$0,715 \pm 0,304$
<i>II</i> (45-64 год.)	6	$6,83 \pm 1,72$	$1,959 \pm 0,664$	$1,381 \pm 0,526$	$0,578 \pm 0,207$
<i>III</i> (65-88 год.)	15	$8,20 \pm 3,07$	$2,120 \pm 0,542$	$1,476 \pm 0,438$	$0,644 \pm 0,254$

5.1.4. Морфометријска анализа фасцикуларне организације и епинеуријумског омотача суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

У односу на контролне испитанике средње старосне доби, број фасцикулуса код испитаника са дијабетесом, односно ПВБ, показао је несигнификантни пораст на

8,17±5,56 код пацијената с дијабетесом, односно на 8,00±2,00 код болесника с васкуларном болести (Табела 2). У поређењу са контролним испитаницима старости од 45 до 64 године болесници исте старосне групе с дијабетесом су показали пораст у све три испитиване арее (2,358±0,554 mm²; 1,742±0,511 mm²; 0,615±0,189 mm²), као и они с ПVB (2,419±1,040 mm²; 1,608±0,636 mm²; 0,811±0,405 mm²), међутим без статистичке значајности (Табела 2).

Табела 2. Просечне вредности броја фасцикулуса, арее целог суралног нерва, арее епинеуријума и укупне фасцикуларне арее суралног нерва код испитаника средње старосне групе

Група испитаника (45-64 год.)	N	Број фасцикулуса	Ареа целог суралног нерва (A _{sn}) (mm ²)	Ареа епинеуријума (A _{ep}) (mm ²)	Укупна фасцикуларна ареа (A _f) (mm ²)
Контрола	6	6,83±1,72	1,959±0,664	1,381±0,526	0,578±0,207
Дијабетес	6	8,17±5,56	2,358±0,554	1,742±0,511	0,615±0,189
ПVB	6	8,00±2,00	2,419±1,040	1,608±0,636	0,811±0,405

Табела 3. Просечан број фасцикулуса, ареа целог суралног нерва, ареа епинеуријума и укупна фасцикуларна ареа суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе

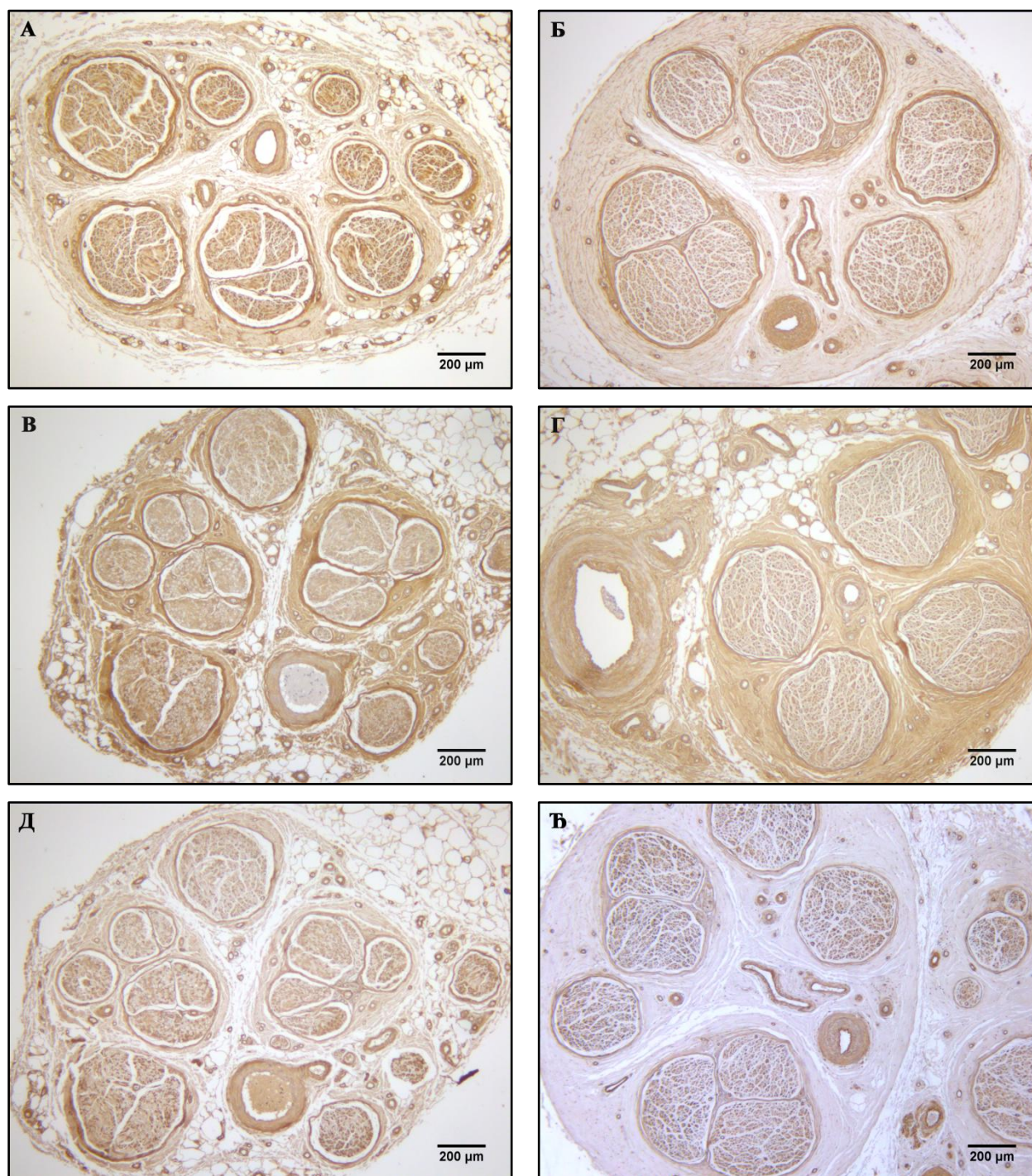
Група испитаника (65-88 год.)	N	Број фасцикулуса	Ареа целог суралног нерва (A _{sn}) (mm ²)	Ареа епинеуријума (A _{ep}) (mm ²)	Укупна фасцикуларна ареа (A _f) (mm ²)
Контрола	15	8,20±3,07	2,120±0,542	1,476±0,438	0,644±0,254
Дијабетес	9	7,00±2,76	2,276±0,937	1,425±0,673	0,851±0,412
ПVB	9	7,67±1,94	2,314±0,525	1,562±0,448	0,752±0,162

Број фасцикулуса код најстаријих испитаника с дијабетесом (7,00±2,76) или ПVB (7,67±1,94) показао је пад у односу на контролне испитанике исте старосне групе који статистички није био значајан (Табела 3). Укупна површина суралног нерва у најстаријој старосној групи била је у просеку већа код пацијената с дијабетесом

($2,276 \pm 0,937$) и васкуларном болести ($2,314 \pm 0,525$), али без сигнификантности. Ареа епинеуријума у дијабетесу је показала незначајан пад на $1,425 \pm 0,673$, док је забележен благи пораст на $1,562 \pm 0,448$ код болесника с ПVB. Укупна фасцикуларна ареа је била већа у обе групе болесника, такође без статистичког значаја ($0,851 \pm 0,412$ у дијабетесу; $0,752 \pm 0,162$ у ПVB; Табела 3).

5.1.5. Имунохистохемијска анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у епинеуријуму суралног нерва са старењем

На хистолошким препаратима суралног нерва испитаника различите старости епинеуријум показује значајну позитивну имунореактивност колагена типа I, и локализовану реактивност колагена IV и ламинина (Слика 5.4.). Имуноореактивност колагена типа IV уочава се на цитоплазми фиброцита смештених на периферији снопова колагених влакана. Крвни судови присутни у епинеуријуму такође показују интензивну пребојеност на колаген типа IV, тј. њихове базалне ламине, глатке мишићне ћелије тунике медије, као и перицити и фибробласти адвентиција већих крвних судова. Екстерна ламина унилокуларних адипоцита такође се боји овим антителом, као и продужеци фиброцита-фибробласта у септама везивног ткива између групица унилокуларних адипоцита. У најстаријој групи испитаника између снопова везивних влакана епинеуријума не уочава се битно различита реакција на колаген типа IV у односу на две млађе групе. У епинеуријуму суралног живца постоји јака, дифузна имунореактивност колагена типа I. Уочавају се снопови влакана позитивних на колаген типа I, као и позитивни фибробласти/фиброцити. Екстерне ламине унилокуларних адипоцита, као и везивноткивне преграде између групица унилокуларних адипоцита показују позитивну експресију колагена типа I. Медија и адвентиција већих крвних судова у епинеуријуму се боје на колаген типа I, при чему су имунопозитивне и глатке мишићне ћелије медије, колагена влакна присутна у медији, као и фибробласти/фиброцити адвентиције. У најстаријој испитиваној групи уочава се интензитет позитивности на колаген типа I у тунци медији већих крвних судова који није значајно мањи у односу на млађе групе. Око мањих крвних судова уочавају се концентрично постављена влакна позитивне реакције на колаген типа I.

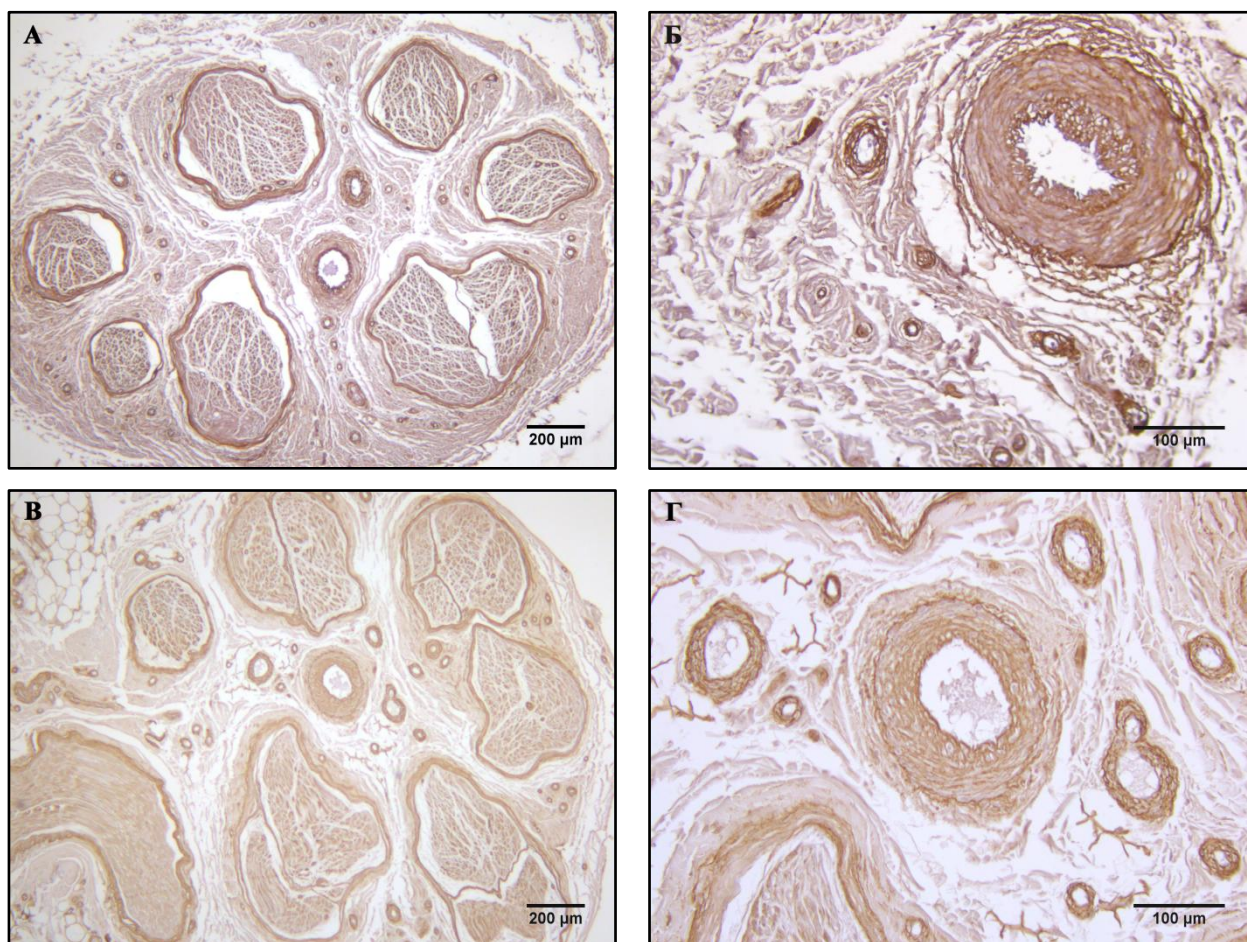


Слика 5.4. Попречни пресеци суралног нерва *I* старосне групе (А, В, Д) и *III* старосне групе (Б, Г, Ђ), имунохистохемијски бојених на колаген типа *IV* (А, Б), типа *I* (В, Г) и ламиин (Д, Ђ). Колаген типа *IV* и ламиин показују највећу имунореактивност у перинеуријуму, крвним судовимаа и у ендонеуријуму око Шванових ћелија. Колаген типа *I* је највише експримиран у епинеуријуму, а може се видети и у ендонеуријуму (увећање 64×).

Имунопозитивност на колаген типа *I* може се уочити и у базалним ламинама крвних судова. Ендотелне ћелије се не боје колагеном типа *I*. Експресија ламинина у

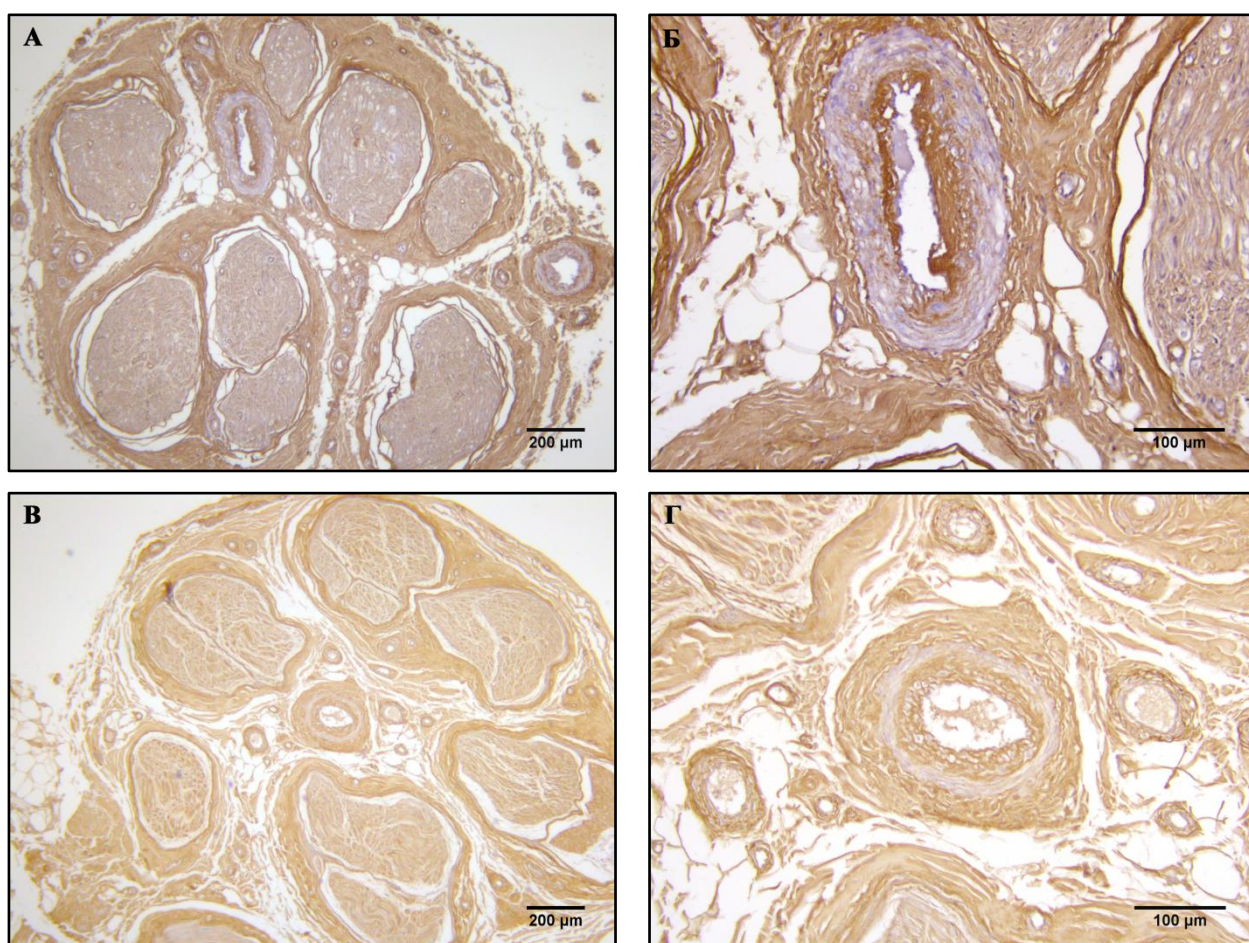
епинеуријуму присутна је на цитоплазми фиброцита смештених око перинеуријума, док се са растојањем од перинеуријума смањује и позитивност фиброцита на ламинин, па чак и изостаје на најпериферније постављеним фиброцитима. Базалне мембране крвних судова, глатке мишићне ћелије медије, перицити и фибробласти адвентиција се такође боје на ламинин. Позитивну имунореактивност на ламинин показују и екстерне ламине унилокуларних адипоцита и везивноткивне септе које раздвајају групице унилокуларних адипоцита.

5.1.6. Имунохистохемијска анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у епинеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

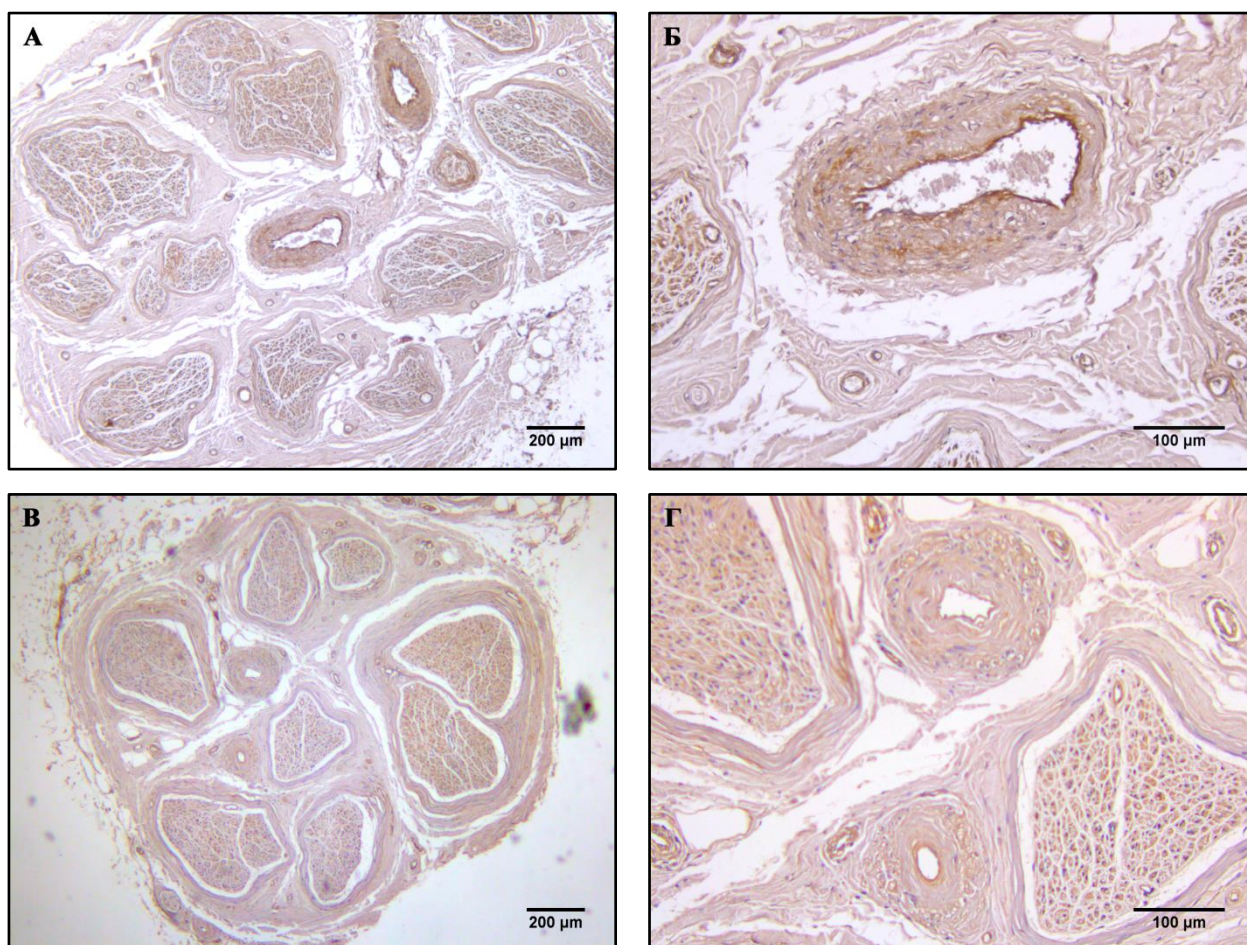


Слика 5.5. Експресија колагена типа IV у епинеуријуму (А, В) и крвним судовима (Б, Г) суралног нерва испитаника са дијабетесом (А, Б) и ПВБ (В, Г). Увећање 64× (А, В) и 200× (Б, Г).

У епинеуријуму суралног нерва испитаника оболелих од дијабетеса и ПВБ присутна је позитивна имунореактивност колагена типа IV (Слика 5.5.), типа I (Слика 5.6.) и ламинина (Слика 5.7.). Анализом испитиваних нерава обе старосне групе није запажена разлика у локализацији и интензитету експресије испитиваних антитела у односу на контролне испитанике. Позитивна имунореактивност колагена типа IV и ламинина уочава се на фиброцитима и у зиду епинеуријумских крвних судова, за разлику од колагена типа I који показује израженију дифузну позитивност у овом везивном омотачу.



Слика 5.6. Експресија колагена типа I у епинеуријуму (А, В) и крвним судовима (Б, Г) суралног нерва испитаника са дијабетесом (А, Б) и ПВБ (В, Г). Увећање 64× (А, В) и 200× (Б, Г).

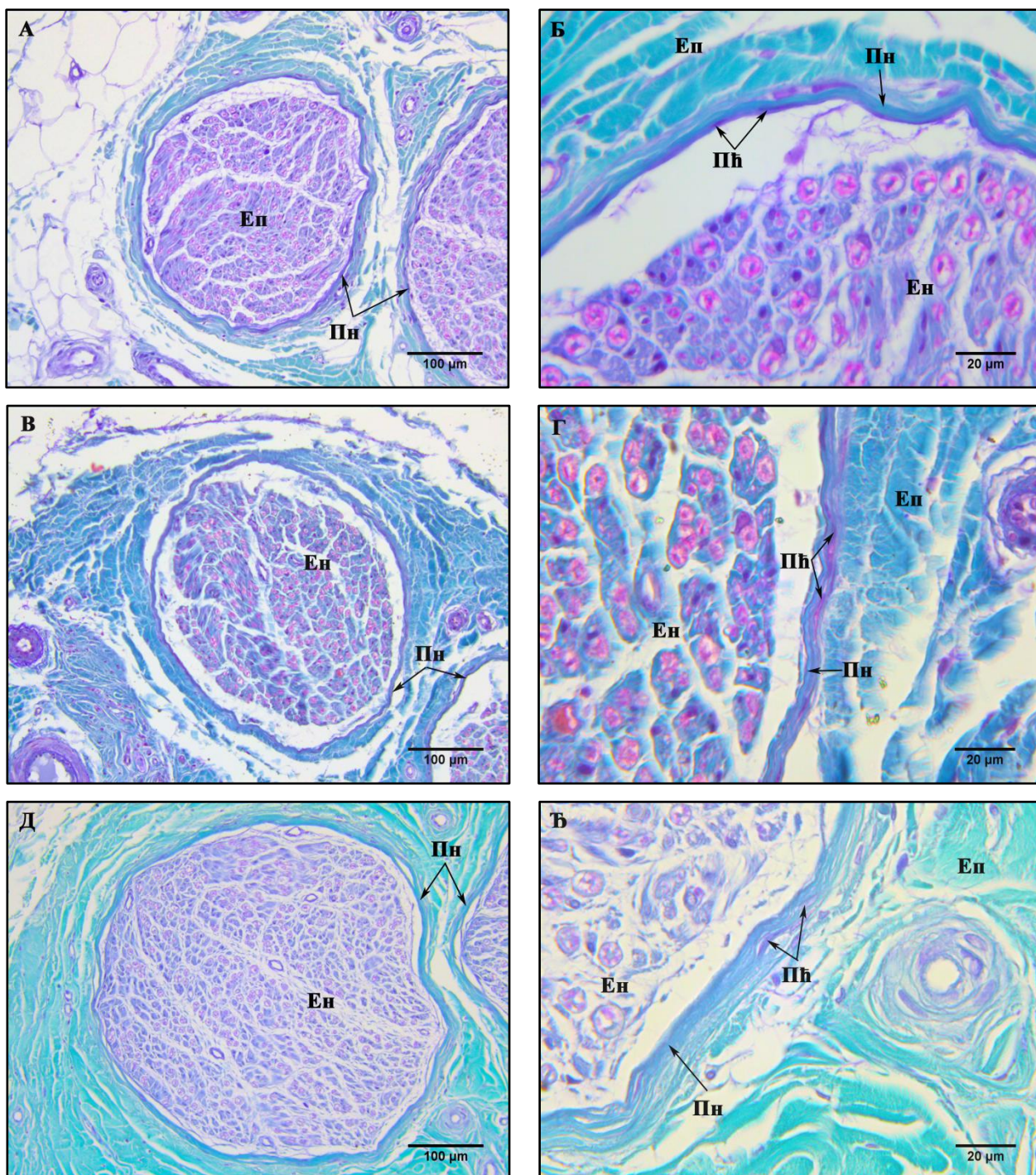


Слика 5.7. Експресија ламинина у епинеуријуму (А, В) и у крвним судовима (Б, Г) суралног нерва испитаника са дијабетесом (А, Б) и ПВБ (В, Г). Увећање 64× (А, В) и 200× (Б, Г).

5.2. Морфолошка и морфометријска анализа перинеуријумског омотача

5.2.1. Морфолошка анализа перинеуријумског омотача са старењем

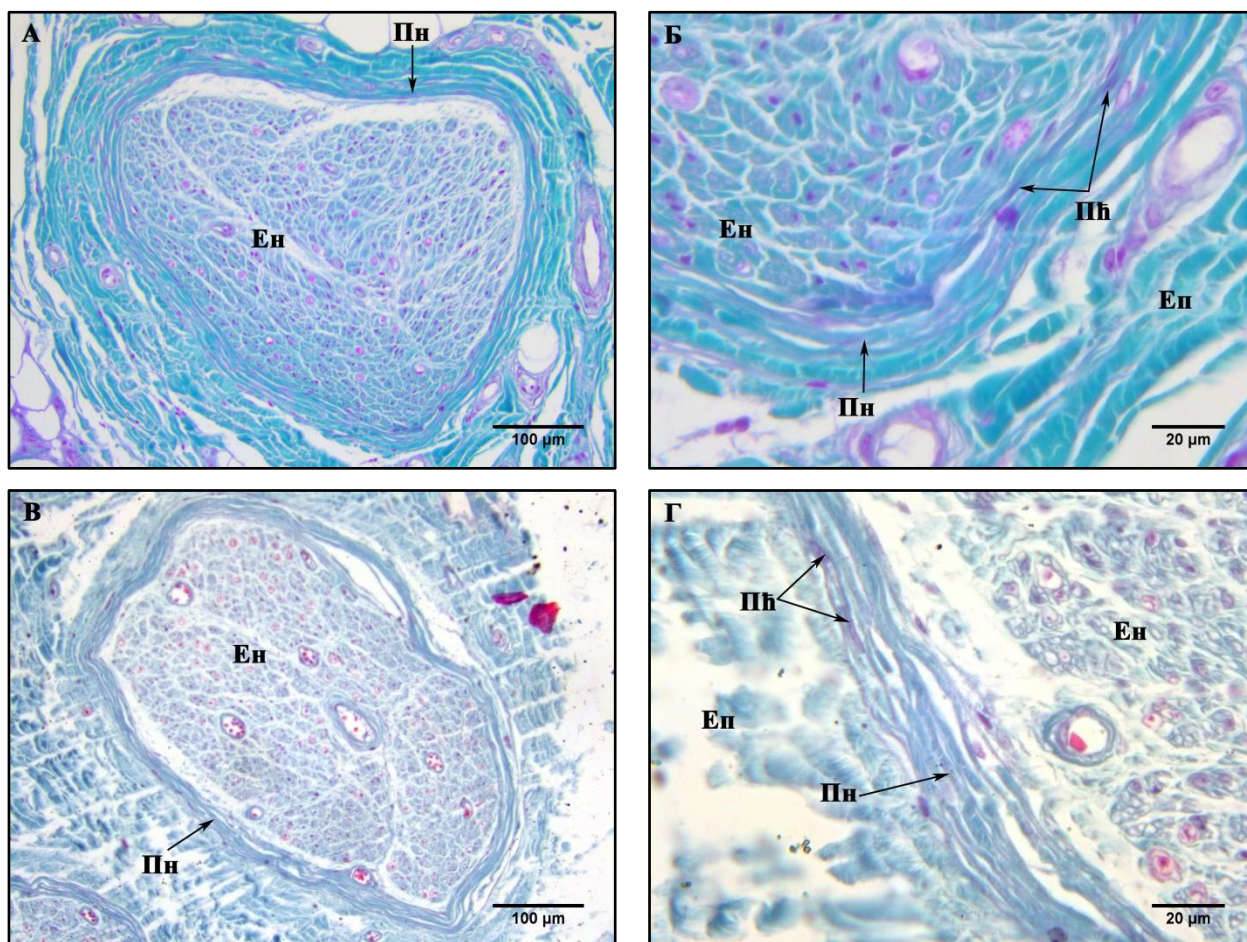
Перинеуријум суралног нерва је ламеларне грађе и прати облик фасцикулуса. Око већих фасцикулуса перинеуријум се састоји и до 7 ћелијских ламела. Број перинеуријумских ламела, као и дебљина перинеуријумског омотача, корелира са величином фасцикулуса, тако да фасцикулуси мањег дијаметра имају тањи перинеуријумски омотач са мањим бројем ламела и обрнуто (Слика 5.8.). У перинеуријуму се запажају издужена једра перинеуријумских ћелија, крвни судови и појединачна мијелинска влакна. Морфолошком анализом фасцикулуса различите величине не стиче се утисак повећања дебљине перинеуријума у току процеса старења.



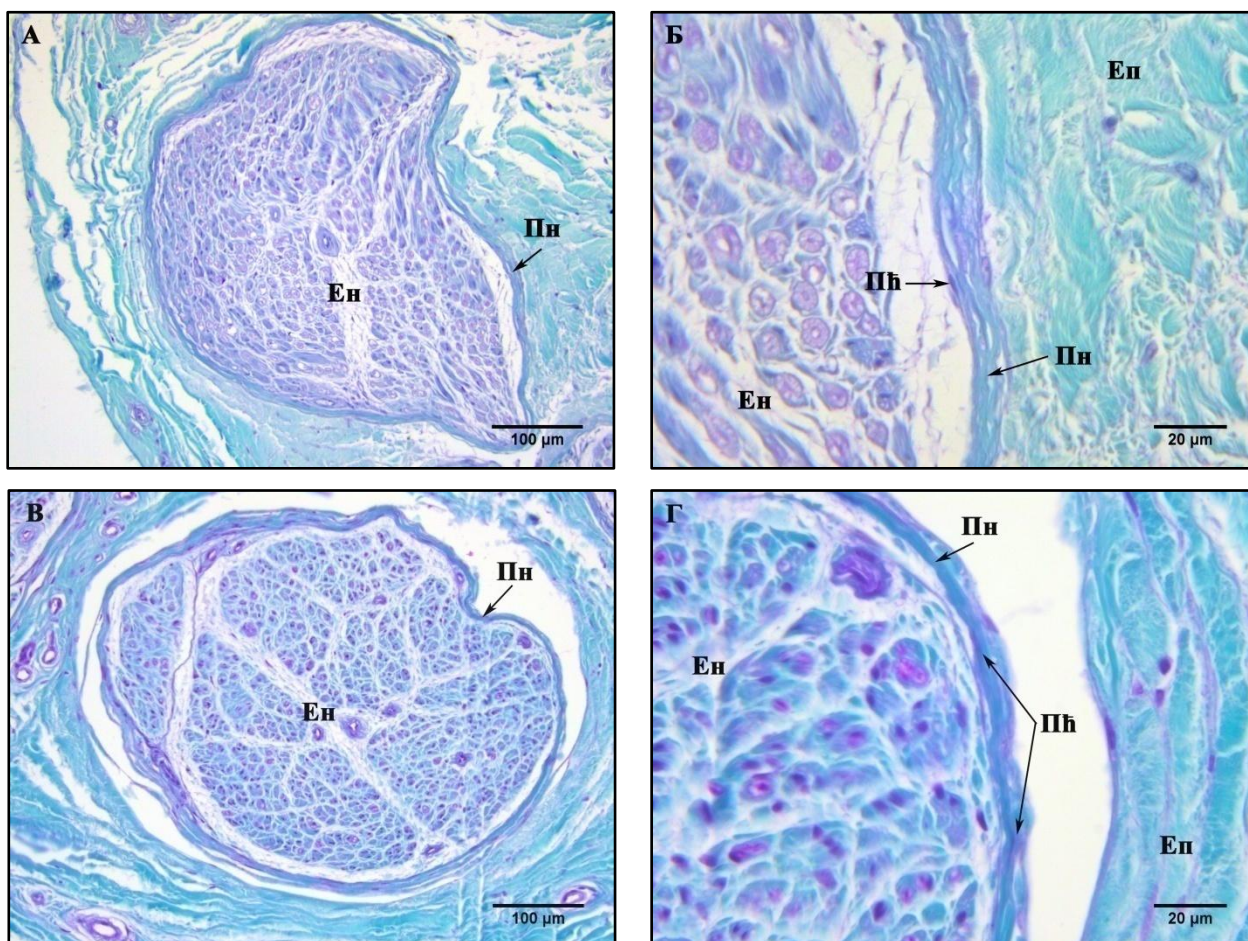
Слика 5.8. Приказ фасцикулуса (А, В, Д) и дела перинеуријумског омотача (Б, Г, Ђ) на попречним пресецима суралног нерва испитаника *I* старосне групе (А, Б); *II* старосне групе (В, Г); *III* старосне групе (Д, Ђ). Еп – епинеуријум; Пн – перинеуријум; Ен – ендонеуријум; Пћ – перинеуријумска ћелија (трихромно бојење по Масону; А/В/Д: увећање 200×; Б/Г/Ђ: увећање 800×).

5.2.2. Морфолошка анализа перинеуријумског омотача пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

Морфолошки перинеуријумски омотач испитаника оболелих од дијабетеса и ПВБ се није разликовао у односу на контролну групу (Слика 5.9, 5.10.). У свим испитиваним нервима перинеуријум је био ламеларне грађе са присутним издуженим једрима перинеуријумских ћелија. У појединим фасцикулусима запажа се већи број једара перинеуријумских ћелија у унутрашњем делу перинеуријума. Стиче се утисак да фасцикулуси суралног нерва испитаника оболелих од дијабетеса (Слика 5.9.) и ПВБ (Слика 5.10.) имају дебљи перинеуријумски омотач у односу на фасцикулусе сличног дијаметра испитаника контролне групе.



Слика 5.9. Приказ фасцикулуса (А, В) и дела перинеуријумског омотача (Б, Г) на попречном пресеку суралног нерва испитаника са дијабетесом мелитусом старосне групе од: 45-64 године (А, Б) и 65-88 година (В, Г). Еп – епинеуријум; Пн – перинеуријум; Ен – ендонеуријум; Пћ – перинеуријумска ћелија (трихромно бојење по Масону; А/В: увећање 200×; Б/Г: увећање 800×).



Слика 5.10. Приказ фасцикулуса (А, В) и дела перинеуријумског омотача (Б, Г) на попречном пресеку суралног нерва испитаника са ПВБ старосне групе од: 45-64 године (А, Б) и 65-88 година (В, Г). Еп – епинеуријум; Пн – перинеуријум; Ен – ендонеуријум; Пћ – перинеуријумска ћелија (трихромно бојење по Масону; А/В: увећање 200×; Б/Г: увећање 800×).

5.2.3. Морфометријска анализа перинеуријумског индекса (*P* индекс) суралног нерва са старењем

Просечна вредност перинеуријумског индекса код испитаника најмлађе старосне групе износила је $5,371 \pm 1,495$. У средњој старосној групи забележен је пораст вредности *P* индекса на $5,712 \pm 2,203$, као и у најстаријој групи на $6,314 \pm 1,866$ (Табела 4), без статистичке значајности.

Табела 4. Просечне вредности P индекса суралног нерва код испитаника различите старости

Старосна група	N	P индекс
I (25-44 год.)	9	5,371±1,495
II (45-64 год.)	6	5,712±2,203
III (65-88 год.)	15	6,314±1,866

5.2.4. Морфометријска анализа перинеуријумског индекса (P индекс) суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

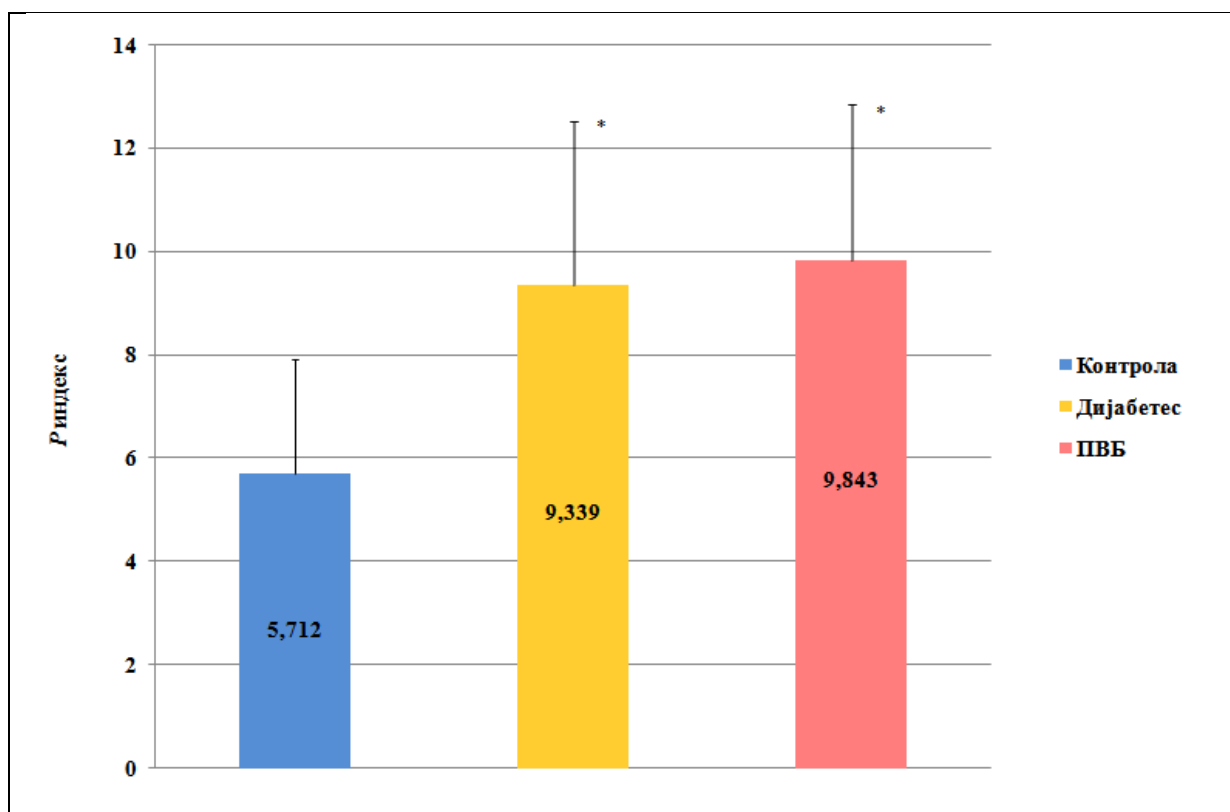
Просечна вредност P индекса суралног нерва код пацијената са дијабетесом је била статистички значајно виша (9,339±3,176; $p<0,05$) у односу на контролне испитанике исте старосне групе, као и код болесника с ПVB (9,843±3,002; $p<0,05$), што је приказано у Табели 5 и на Графикону 1.

Табела 5. Просечне вредности P индекса суралног нерва код испитаника средње старосне групе

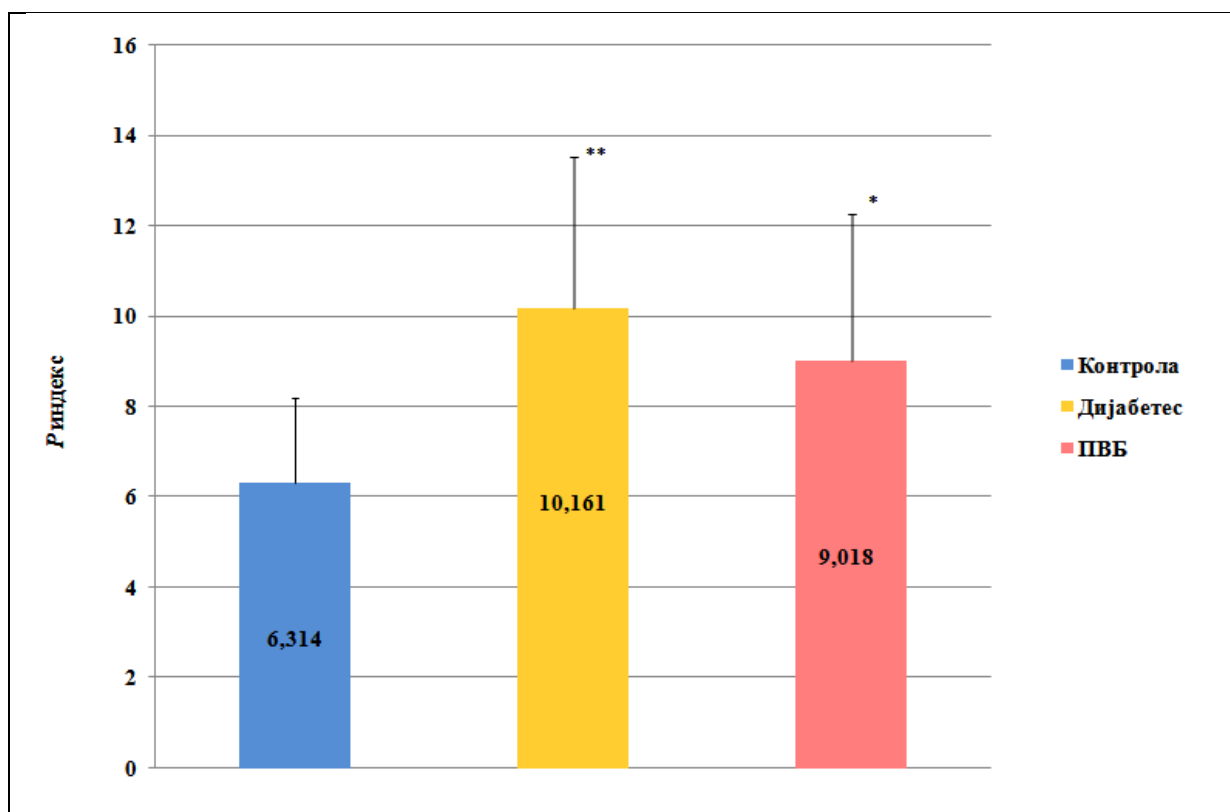
Група испитаника (45-64 год.)	N	P индекс
Контрола	6	5,712±2,203
Дијабетес	6	9,339±3,176 *
ПVB	6	9,843±3,002 *

* $p<0,05$

У односу на контролне испитанике најстарије старосне групе, вредности P индекса су биле статистички значајно више у обе групе пацијената (табела 6, графикон 2). Код болесника са дијабетесом P индекс је износио 10,161±3,352 ($p<0,01$), а код пацијената с васкуларном болести 9,018±3,242 ($p<0,05$).



Графикон 1. Просечне вредности P индекса суралног нерва код испитаника средње старосне групе (45-64 год.)



Графикон 2. Просечне вредности P индекса суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе (65-88 год.)

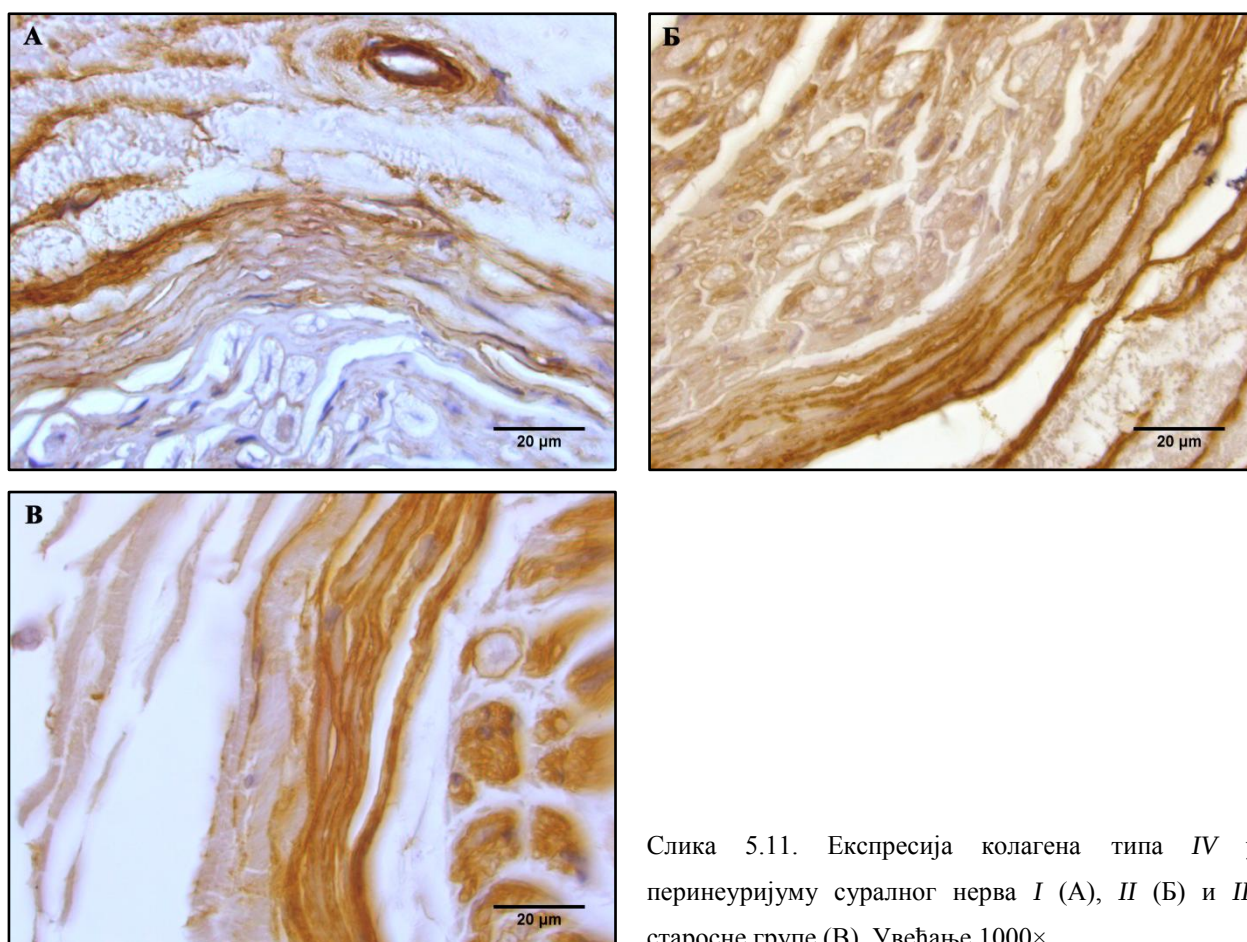
Табела 6. Просечне вредности P индекса суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе

Група испитаника (65-88 год.)	N	P индекс
Контрола	15	$6,314 \pm 1,866$
Дијабетес	9	$10,161 \pm 3,352^{**}$
ПВБ	9	$9,018 \pm 3,242^{*}$

* $p < 0,05$

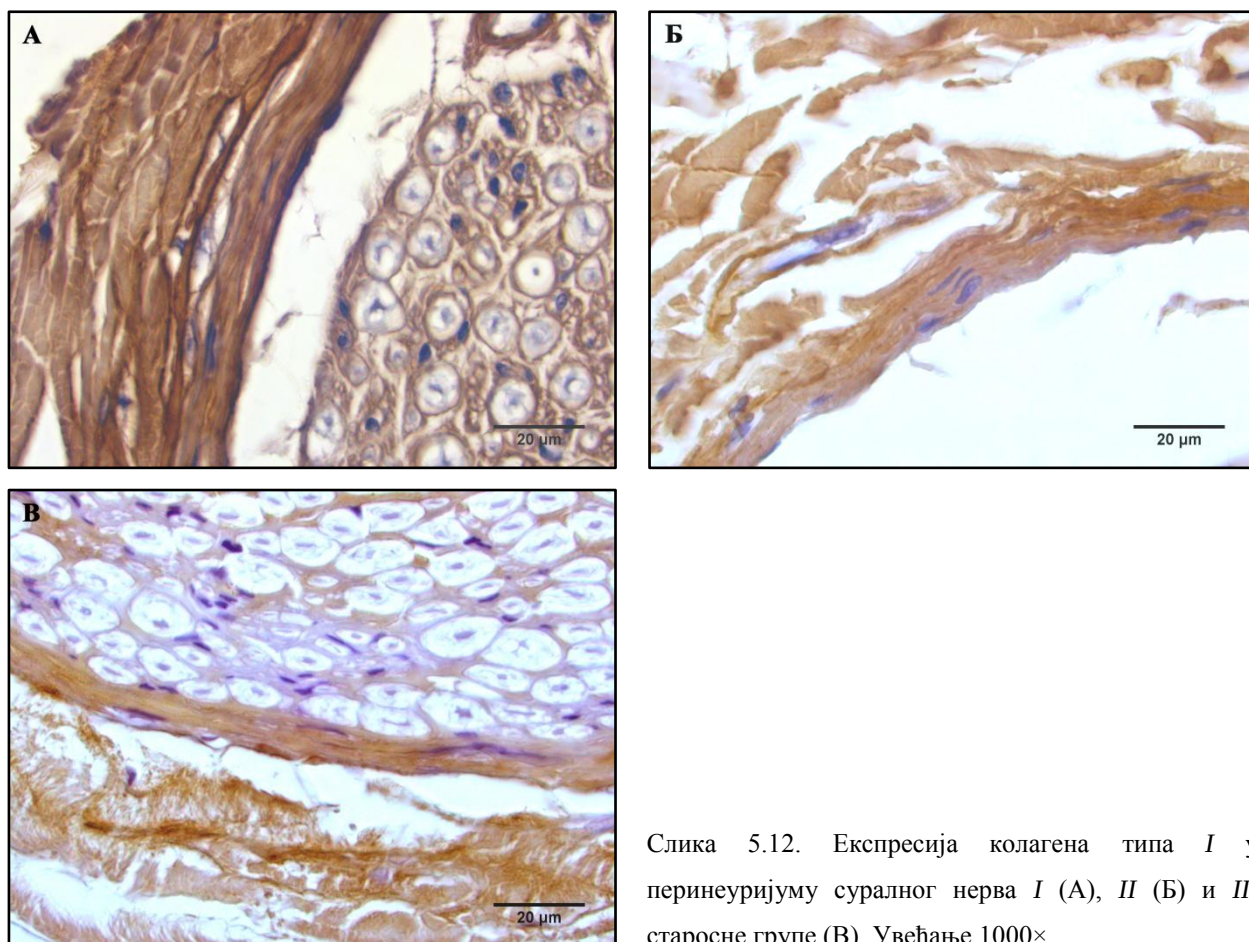
** $p < 0,01$

5.2.5. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва са старењем



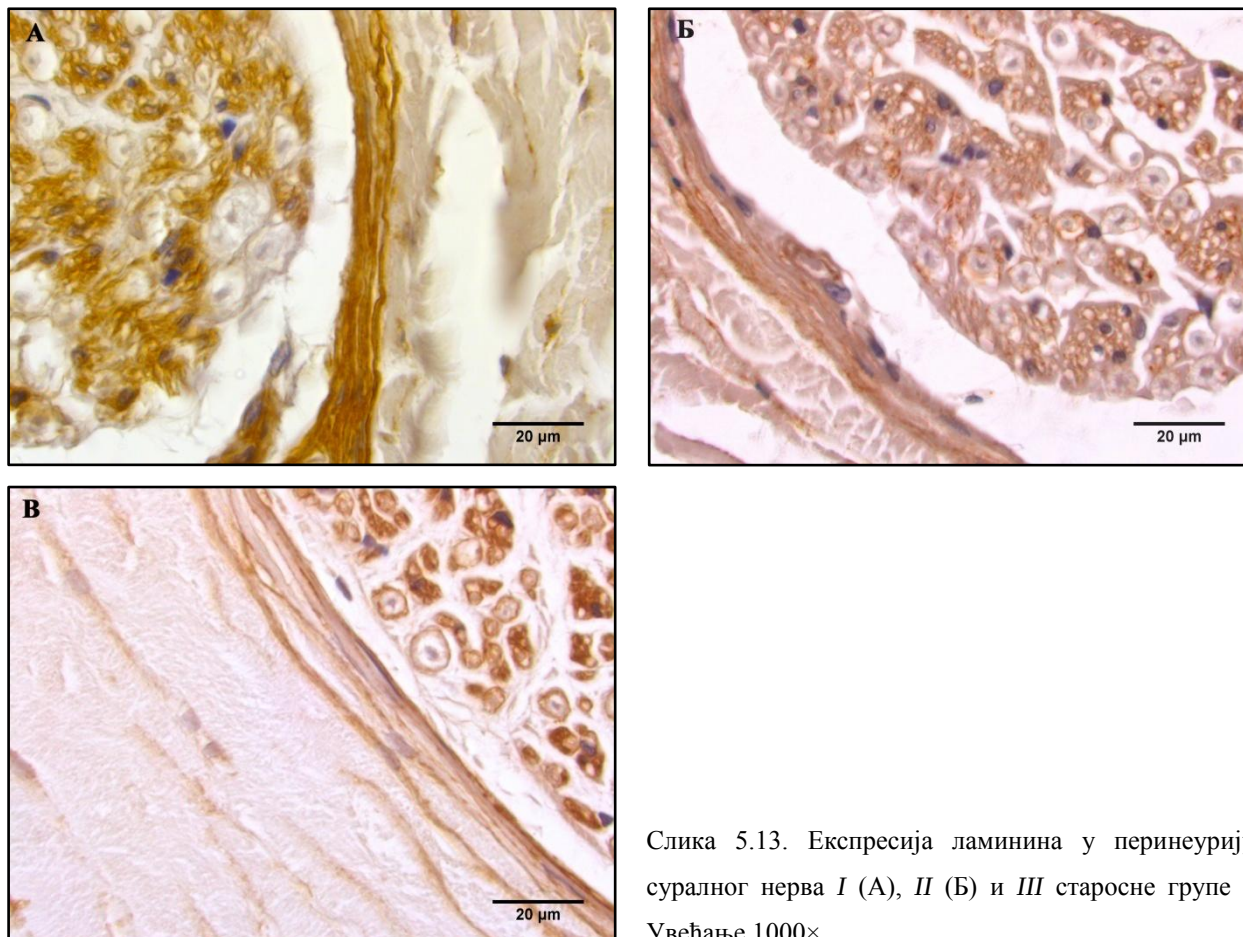
Слика 5.11. Експресија колагена типа IV у перинеуријуму суралног нерва I (А), II (Б) и III старосне групе (В). Увећање 1000×.

Перинеуријумски омотач суралног нерва показује значајну имунореактивност колагена типа *IV* и ламинина, док је имунореактивност колагена типа *I* слабије изражена. У вишеслојном перинеуријумском омотачу имунореактивност колагена типа *IV* је јасно изражена и показује концентрични аранжман (Слика 5.11.). Концентрична имунореактивност уочава се између перинеуријумских ћелијских ламела и у цитоплазми перинеуријумских ћелија. Изражена имунопозитивност у перинеуријуму јасно одваја ендонеуријум од епинеуријума који имају слабију и локализовану реактивност колагена типа *IV*. Анализом нерава испитаника различите старости запажа се израженија имунореактивност на колагена типа *IV* код испитаника старије доби. У перинеуријуму постоји слабија имунореактивност колагена типа *I* која потиче од везивоткивних влакана перинеуријума, као и од спљоштених перинеуријумских ћелија овог везивоткивног омотача позитивних на бојење антителом на колаген типа *I* (Слика 5.12.). Код испитаника старије доби запажа се слабија имунореактивност колагена типа *I* у односу на млађе испитанике.



Слика 5.12. Експресија колагена типа *I* у перинеуријуму суралног нерва *I* (А), *II* (Б) и *III* старосне групе (В). Увећање 1000×.

Перинеуријумске ћелије суралног нерва експримирају позитивност на ламинин која такође показује концентрични аранжман. Међутим, уочава се да је имунореактивност код старијих испитаника слабије изражена (Слика 5.13.).

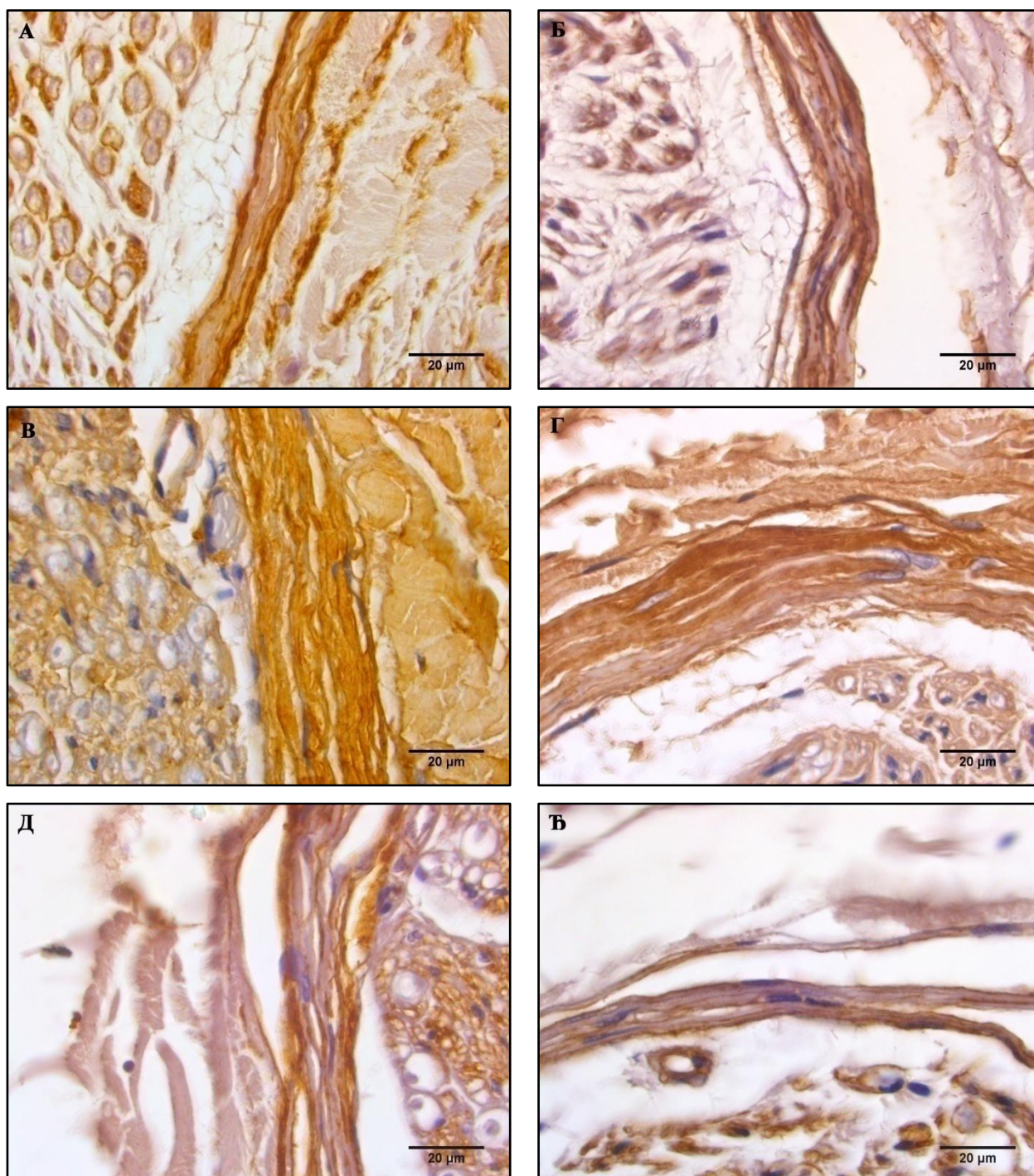


Слика 5.13. Експресија ламинина у перинеуријуму суралног нерва I (А), II (Б) и III старосне групе (В). Увећање 1000×.

5.2.6. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

Перинеуријум фасцикулуса суралног нерва испитаника са дијабетесом и ПВБ показују исти модел експресије колагена типа I, IV и ламинина који је описан код контролних испитаника. Упоредивањем интензитета експресије у перинеуријуму испитаника оболелих од дијабетеса уочава се интензивнија имунореактивност колагена типа I у односу на контролну групу старије доби. Анализом интензитета имунореактивности перинеуријума испитаника оболелих од ПВБ запажа се значајно

већа експресија колагена типа *I*, *IV*, као и ламинина, у односу на контролне испитанике, и то у обе старосне групе (Слика 5.14.).



Слика 5.14. Експресија колагена типа *IV* (А, Б), типа *I* (В, Г) и ламинина (Д, Ђ) у перинеуријуму суралног нерва средње (А/В/Д) и најстарије старосне групе (Б/Г/Ђ) испитаника са ПВБ. Увећање 1000 $\times$.

5.2.7. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва са старењем

Анализом присуства колагена типа IV у перинеуријуму суралног нерва добијени су резултати који указују на значајан пораст овог типа колагена са старењем (Табела 7, Графикон 3). Процентуална заступљеност у најмлађој старосној групи је износила $12,927 \pm 5,425\%$, у средњој је дошло до статистички значајног пораста на $26,026 \pm 13,316\%$ ($p < 0,001$), као и у најстаријој групи здравих испитаника на $28,059 \pm 7,437\%$ ($p < 0,001$). Просечна заступљеност колагена типа I у перинеуријуму суралног нерва у току старења изражена у процентима показује смањење присуства са порастом година. У најмлађој старосној групи она је износила $13,675 \pm 4,581\%$, а затим опала на $9,828 \pm 3,706\%$ у средњој, односно на $8,395 \pm 2,902\%$ у најстаријој старосној групи. Статистичка значајност у средњој групи износи $p < 0,01$, а у најстаријој $p < 0,001$ (Табела 7, Графикон 3). Резултати из Табеле 7 указују на смањење присуства ламинина у перинеуријуму суралног нерва са старењем. У I старосној групи просечна процентуална заступљеност износила је $15,803 \pm 5,256\%$. Пад је забележен у II старосној групи, с вредношћу од $10,452 \pm 3,536\%$ и значајношћу од $p < 0,001$. Просечни постотак од $6,586 \pm 2,508\%$ у III старосној групи значајно је мањи и од I ($p < 0,001$) и од II старосне групе ($p < 0,001$).

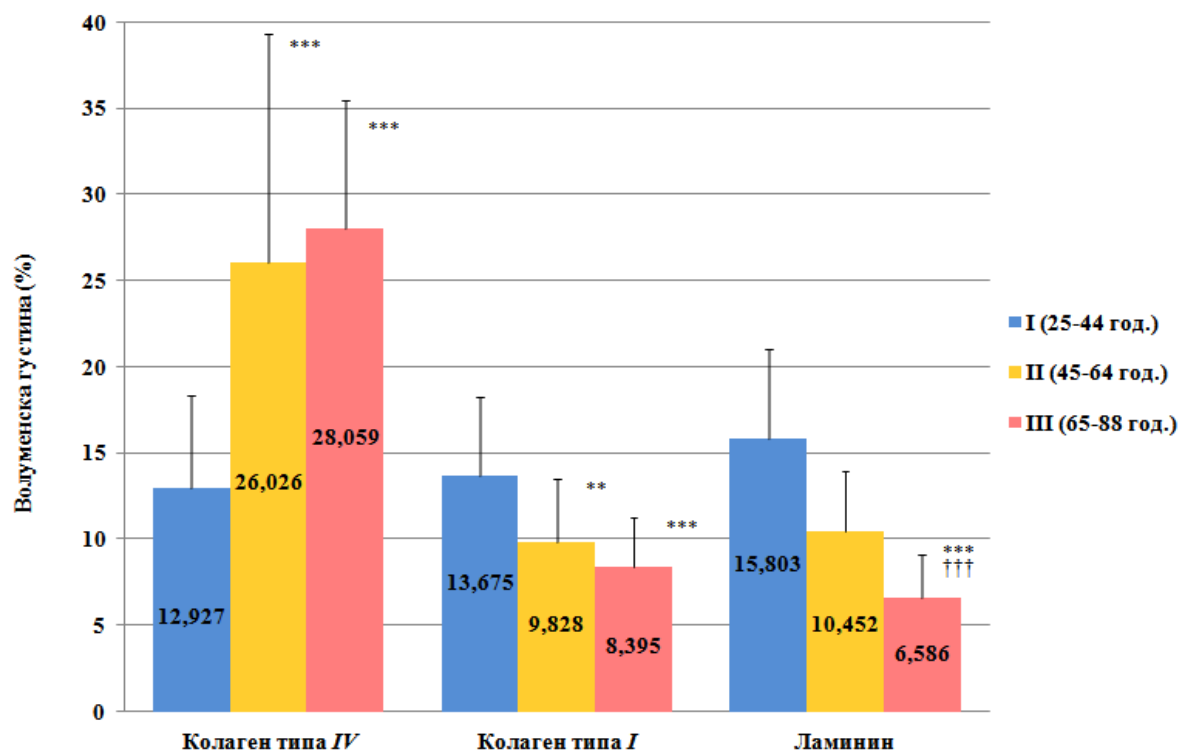
Табела 7. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV ($V_{VCI\text{IV}}$), типа I (V_{VCI}) и ламинина (V_{VL}) у перинеуријуму суралног нерва код испитаника различите старости

Старосна група	N	$V_{VCI\text{IV}}$ (%)	V_{VCI} (%)	V_{VL} (%)
I (25-44 год.)	9	$12,927 \pm 5,425$	$13,675 \pm 4,581$	$15,803 \pm 5,256$
II (45-64 год.)	6	$26,026 \pm 13,316$ ***	$9,828 \pm 3,706$ **	$10,452 \pm 3,536$ ***
III (65-88 год.)	15	$28,059 \pm 7,437$ ***	$8,395 \pm 2,902$ ***	$6,586 \pm 2,508$ ***,†††

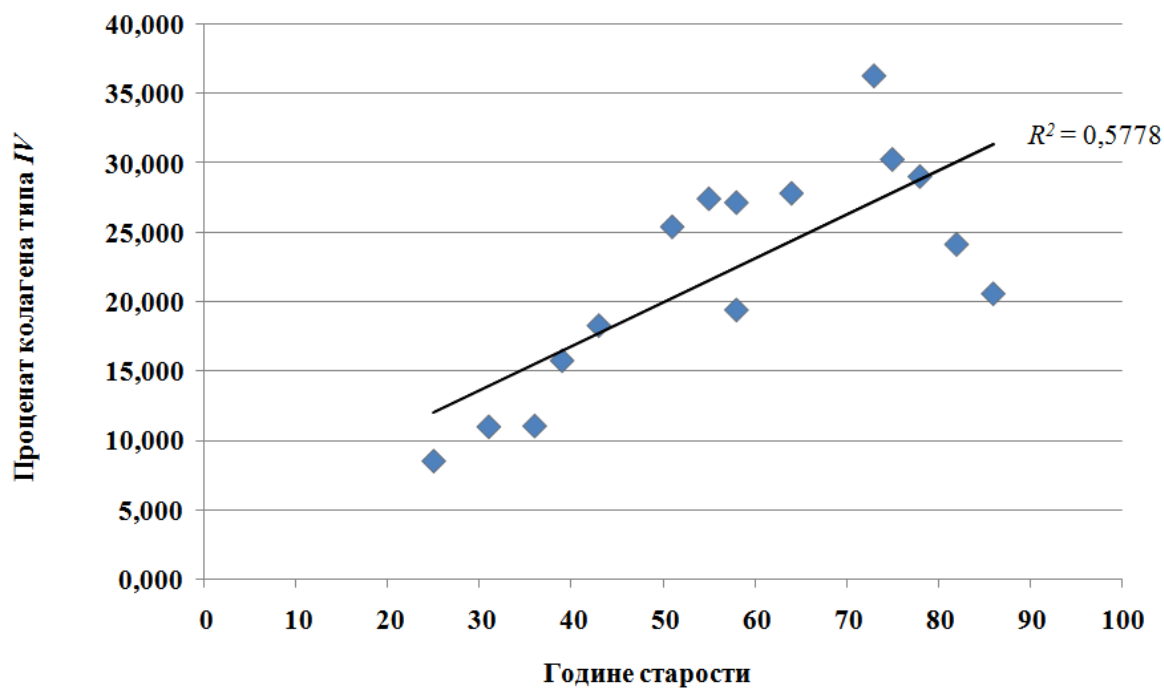
** $p < 0,01$ према I групи

*** $p < 0,001$ према I групи

††† $p < 0,001$ према II групи



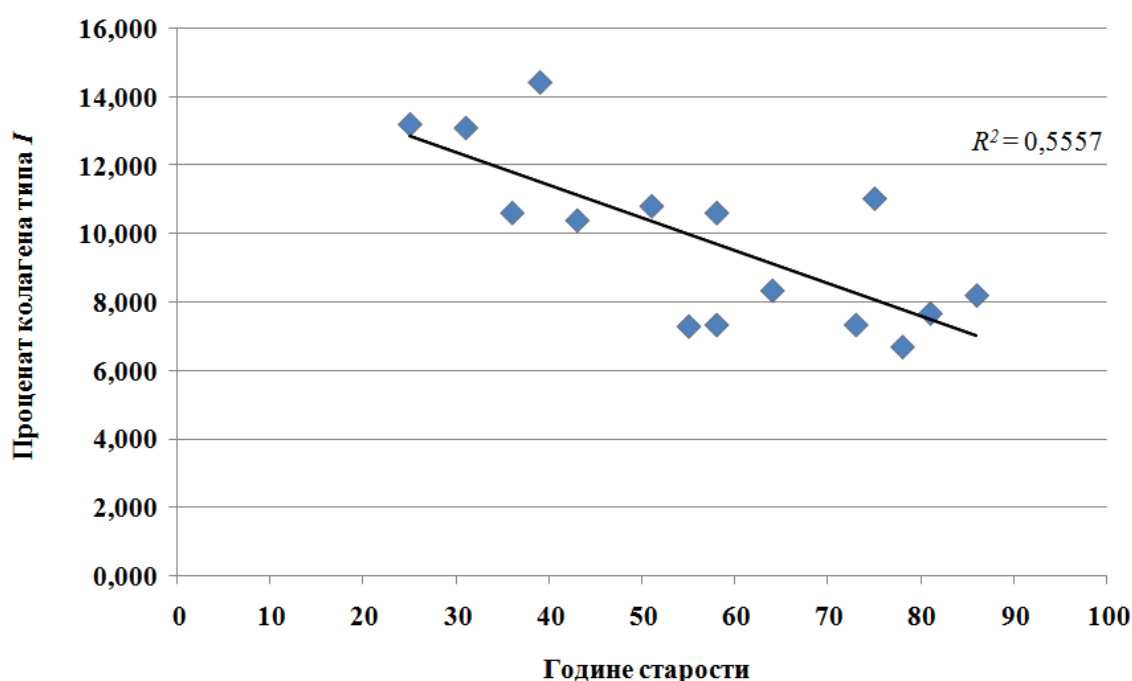
Графикон 3. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV, типа I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва код испитаника различите старости



Графикон 4. Корелација присуства колагена типа IV у перинеуријуму испитаника са годинама старости

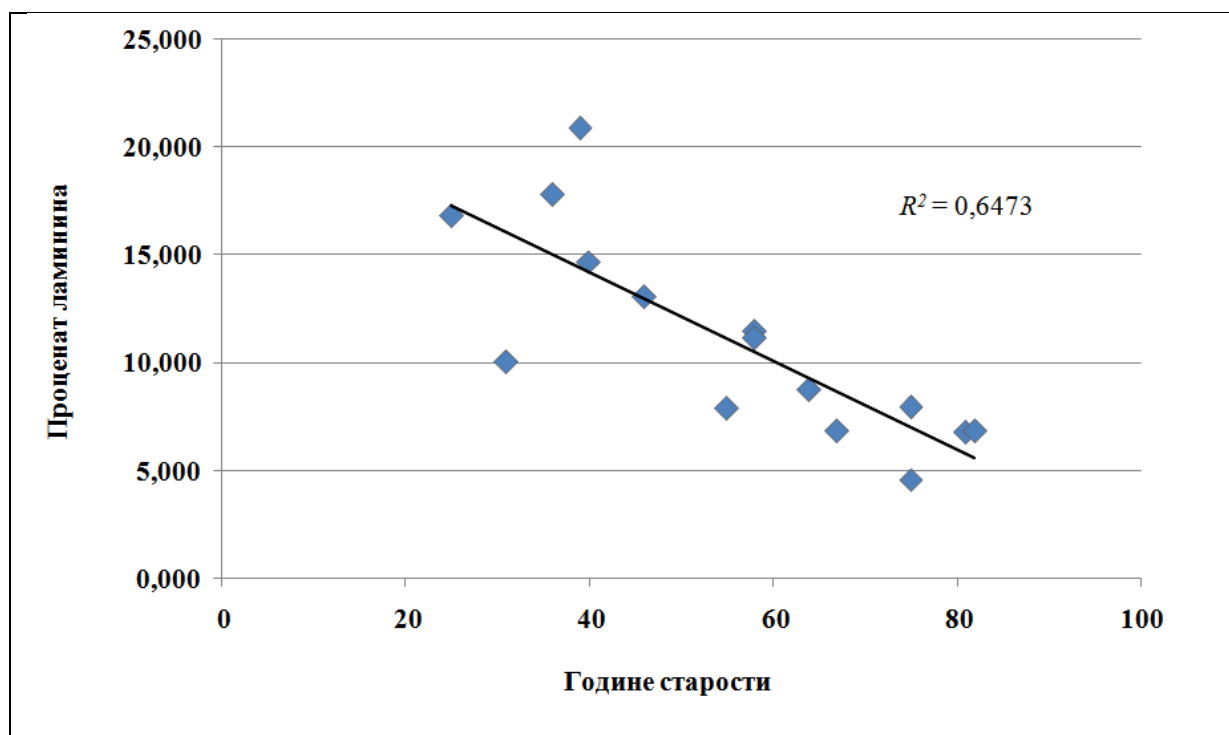
Веза између старења и присуства колагена типа *IV* у перинеуријуму суралног нерва види се на Графикону 4. Утврђена је значајна позитивна корелација, са коефицијентом линеарне регресије од 0,760, односно коефицијентом детерминације од 0,5778, и значајношћу од $p < 0,01$.

Код испитаника три различите старосне групе забележена је значајна негативна корелација експресије колагена типа *I* у перинеуријуму суралног нерва и година старости испитаника са коефицијентом детерминације од 0,5557 и коефицијентом линеарне регресије од -0,745 ($p < 0,01$), што је приказано на Графикону 5.



Графикон 5. Корелација присуства колагена типа *I* у перинеуријуму испитаника са годинама старости

На Графикону 6 представљена је јака негативна корелација година старости са процентуалном заступљености ламинина у перинеуријуму испитаника. Вредност коефицијента детерминације износи 0,6473, што показује да су вредности ламинина са 64,73% одређене старошћу испитаника. Добијени коефицијент линеарне корелације износи -0,805, са значајношћу $p < 0,001$.



Графикон 6. Корелација присуства ламинина у перинеуријуму испитаника са годинама старости

5.2.8. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

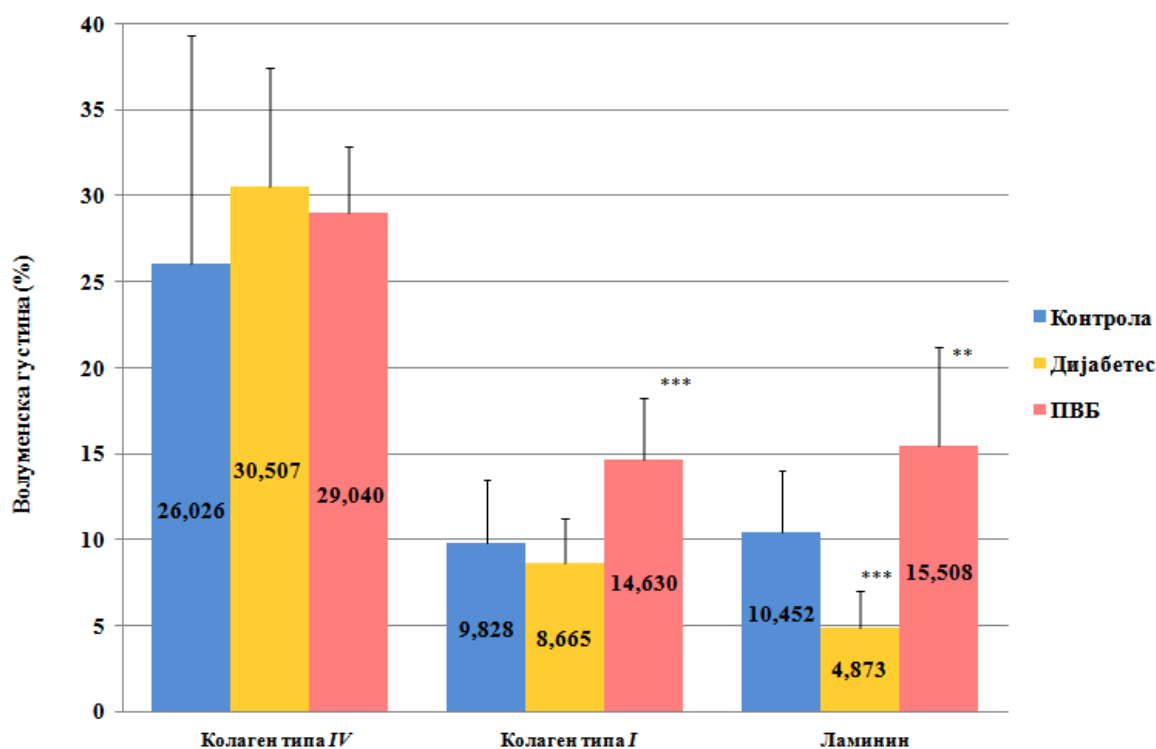
Присуство колагена типа IV у перинеуријуму испитаника средње старосне групе показало је пораст код болесника са дијабетесом ($30,507 \pm 6,892\%$) и ПВБ ($29,040 \pm 3,833\%$) који није био статистички значајан (Табела 8, Графикон 7). Вредност експресије колагена типа I у перинеуријуму суралног нерва код испитаника са дијабетесом у средњој старосној групи износила је $8,665 \pm 2,571\%$, док је статистички значајан пораст у односу на контролне испитанике исте групе забележен код пацијената са васкуларном болести ($14,630 \pm 3,629\%$; $p < 0,01$) (Табела 8, Графикон 7). Присуство ламинина у перинеуријуму особа са дијабетесом средње групе било је значајно мање у односу на контролне испитанике исте групе и у процентима је износило $4,873 \pm 2,156\%$ ($p < 0,001$). У групи пацијената с ПВБ забележен је пораст ламинина у односу на здраве испитанике на $15,508 \pm 5,659\%$ који је такође показао статистичку значајност ($p < 0,01$) (Табела 8, Графикон 7).

Табела 8. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV (V_{VCIV}), типа I (V_{VCI}) и ламинина (V_{VL}) у перинеуријуму суралног нерва у перинеуријуму суралног нерва код испитаника средње старосне групе

Група испитаника (45-64 год.)	N	V_{VCIV} (%)	V_{VCI} (%)	V_{VL} (%)
Контрола	6	26,026±13,316	9,828±3,706	10,452±3,536
Дијабетес	6	30,507±6,892	8,665±2,571	4,873±2,156 ***
ПВБ	3	29,040±3,833	14,630±3,629 **	15,508±5,659 **

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$



Графикон 7. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV, типа I и ламинина у перинеуријуму суралног нерва у перинеуријуму суралног нерва код испитаника средње старосне групе (45-64 год.)

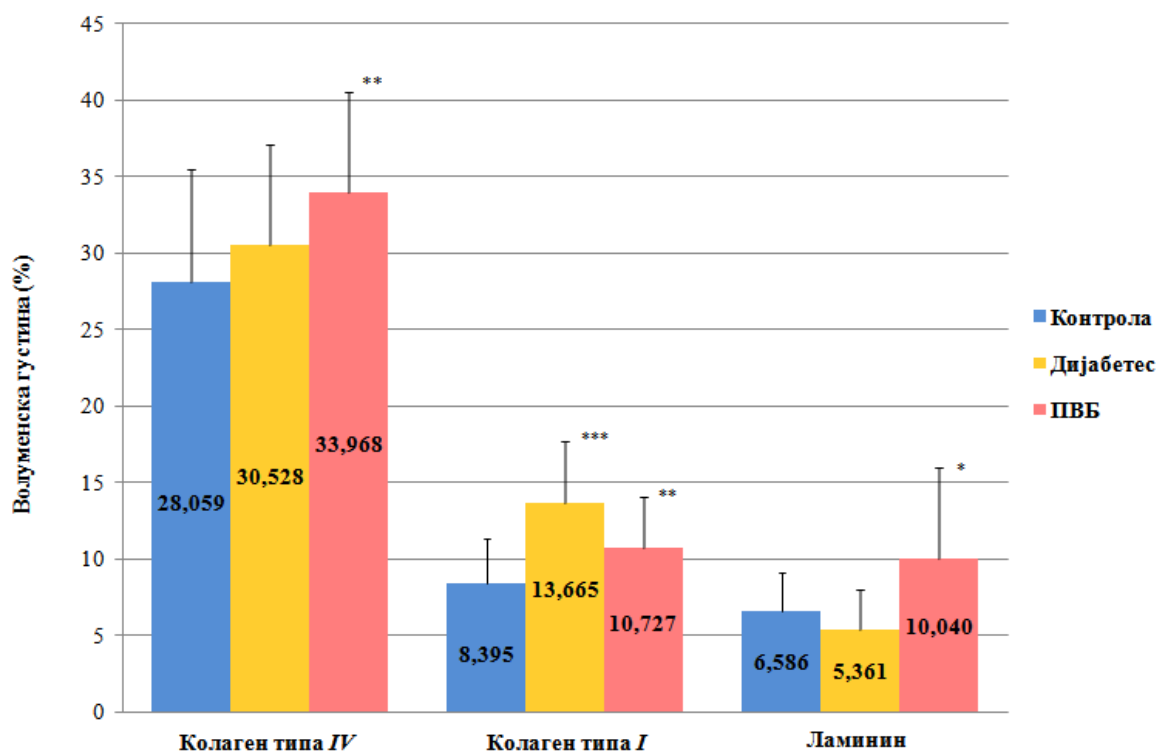
Експресија колагена типа IV у перинеуријуму испитаника најстарије старосне групе карактерише се већим присуством код пацијената са дијабетесом ($30,528 \pm 6,525\%$) и васкуларном болести ($33,968 \pm 6,545\%$), при чему је код потоњих

разлика статистички сигнификантна ($p < 0,01$) (Табела 9, Графикон 8). Присуство колагена типа *I* у перинеуријуму суралног нерва најстаријих испитаника показује пораст у групама са дијабетесом и ПВБ у односу на контролу.

Табела 9. Просечне вредности волуменске густине колагена типа *IV* ($V_{VCI\text{IV}}$), типа *I* (V_{VCI}), и ламинина (V_{VL}) у перинеуријуму суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе

Група испитаника (65-88 год.)	<i>N</i>	$V_{VCI\text{IV}}$ (%)	V_{VCI} (%)	V_{VL} (%)
Контрола	15	28,059±7,437	8,395±2,902	6,586±2,508
Дијабетес	6	30,528±6,525	13,665±4,056 ***	5,361±2,689
ПВБ	9	33,968±6,545 **	10,727±3,353 **	10,040±5,918 *

* $p < 0,05$
 ** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$



Графикон 8. Просечне вредности волуменске густине колагена типа *IV*, *I*, и ламинина у перинеуријуму суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе (65-88 год.)

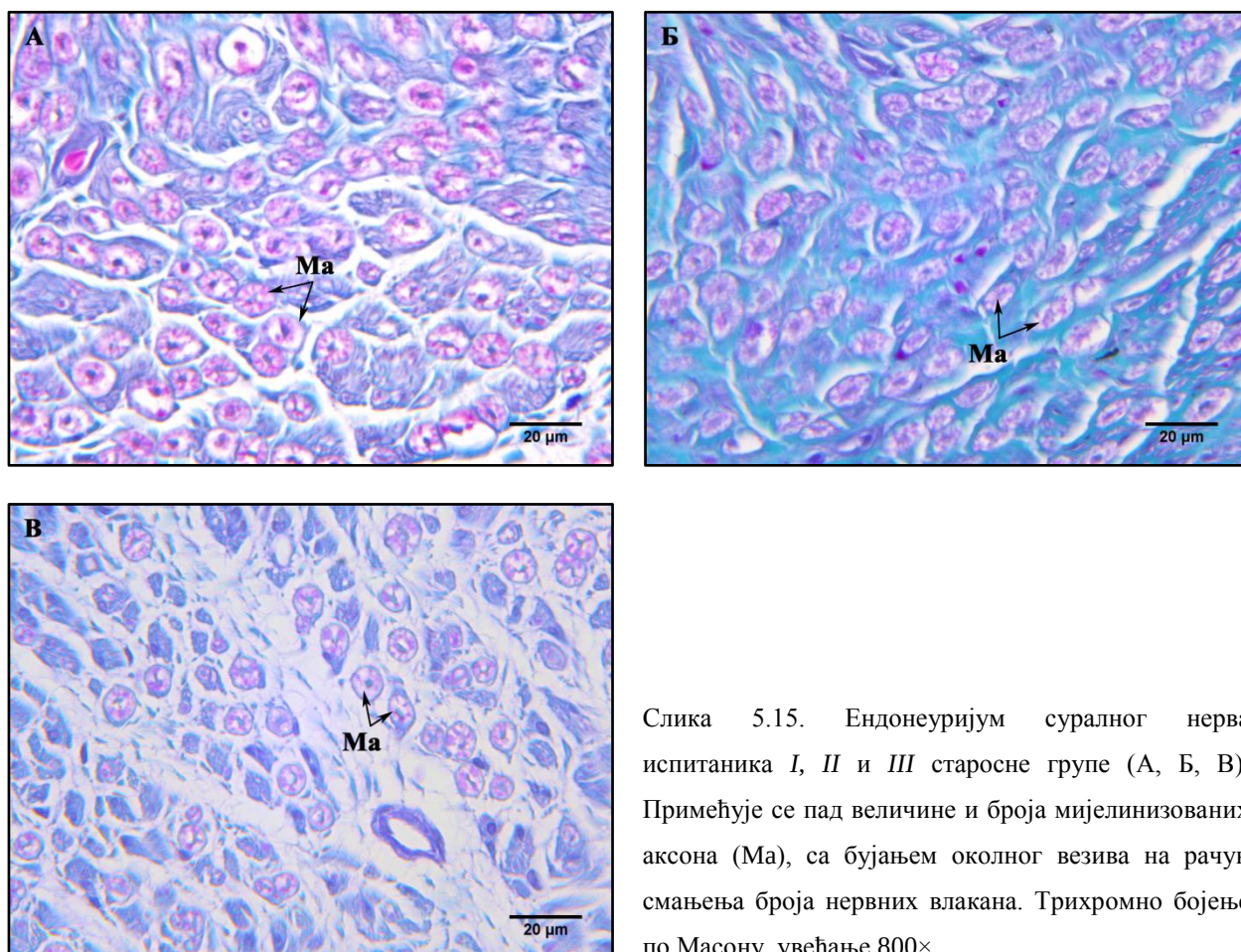
У групи са дијабетесом забележен је статистички сигнификантан пораст на $13,665 \pm 4,056\%$ ($p < 0,001$), а у групи с васкуларном болести процентуална заступљеност је износила $10,727 \pm 3,353\%$, са значајношћу од $p < 0,01$ (Табела 9, Графикон 8). Просечни постотак присуства ламинина код најстаријих болесника са дијабетесом био је нижи од контролних испитаника исте групе ($5,361 \pm 2,689\%$), али без сигнификантности. Налаз у групи с васкуларном болести показао је повишену експресију ламинина у перинеуријуму у односу на контролу ($10,040 \pm 5,918\%$), са статистичком значајношћу од $p < 0,05$ (Табела 9, Графикон 8).

5.3. Морфолошка и морфометријска анализа ендонеуријума

5.3.1. Морфолошка анализа ендонеуријума са старењем

Анализом ендонеуријумског простора фасцикулуса суралног нерва детектовано је присуство везивног ткива у коме се налазе мијелинска влакна, једра фиброцита и Шванових ћелија, као и крвни судови. У већим фасцикулусима могу се уочити везивне преграде које полазе од унутрашње стране перинеуријума и деле фасцикулус на супфасцикуларне јединице. У описаним интрафасцикуларним преградама често су присутни крвни судови, па се стиче утисак груписаности нервних влакана. Највећи број аксона је на попречном пресеку, мада се могу уочити и уздужни пресеци аксона. На попречним пресецима јасно се могу уочити аксони око којих се види мијелин попут црвено зрнастог пребојеног омотача.

Код испитиваних нерава прве старосне групе у ендонеуријуму се уочава знатно веће присуство великих мијелинска влакна у односу на мијелинска влакна мањег калибра, док је везивно ткиво ендонеуријума оскудно присутно. Код испитаника друге старосне групе стиче се утисак смањеног присуства великих мијелинских влакана са повећањем присуства везивног ткива ендонеуријума. У ендонеуријуму најстарије групе испитиваних живаца знатно су присутнија мијелинска влакна мањег калибра која су најчешће груписана у кластере. Велика мијелинска влакна су ретка, са тањим мијелинским омотачем, уз знатно повећање количине ендонеуријумског везивног ткива. Ретко су присутна мијелинских влакана са диспропорционално дебелим мијелинским омотачем, што указује на аксонску атрофију (Слика 5.15.).

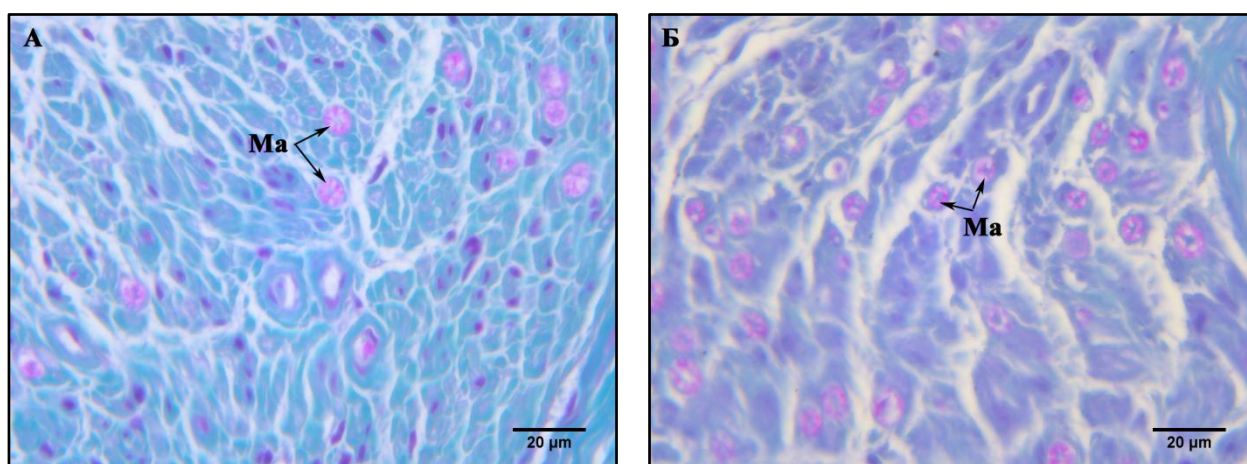


Слика 5.15. Ендонеуријум суралног нерва испитаника I, II и III старосне групе (А, Б, В). Примећује се пад величине и броја мијелинизованих аксона (Ма), са бујањем околног везива на рачун смањења броја нервних влакана. Трихромно бојење по Масону, увећање 800×.

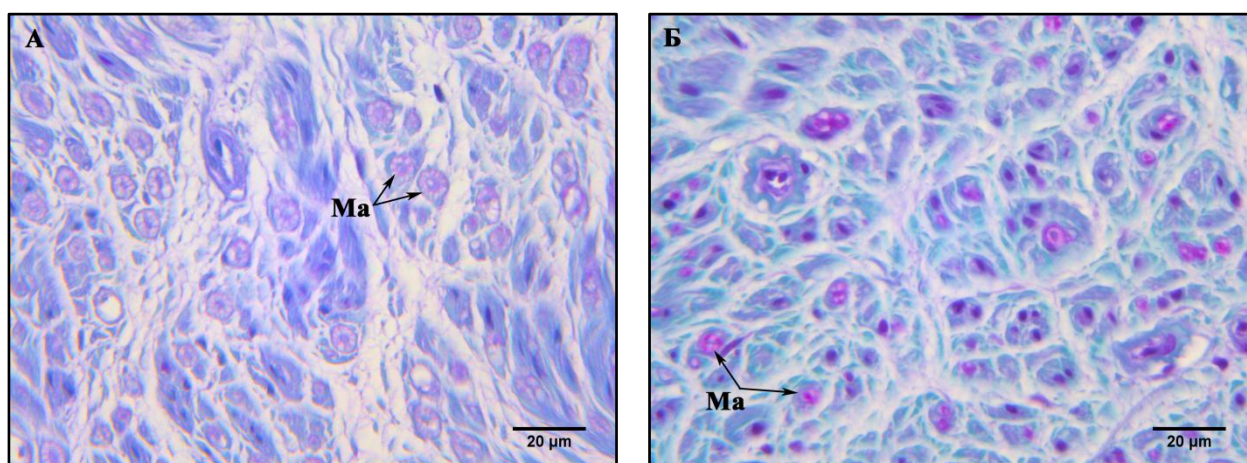
5.3.2. Морфолошка анализа ендонеуријума пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

У ендонеуријуму суралних нерава испитаника оболелих од дијабетеса и ПВБ такође је присутно везивно ткиво, велика и мала мијелинска влакна, једра фиброцита и Шванових ћелија, као и крвни судови различитог калибра. Код анализираних живаца старије групе испитаника оболелих од дијабетеса уочена је варијабилност у морфологији ендонеуријумског садржаја (Слика 5.16.). У већини испитиваних нерава уочена је централна фасцикуларна дегенерација са фокалним губитком мијелинских влакана у ендонеуријуму испитаника. Велика мијелинска влакна су ретка док су мала мијелинска нервна влакна најчешће груписана у кластере. У односу на контролну групу у ендонеуријуму примећен је већи број влакана са знацима аксонске атрофије, сегментне демиелинизације и ремиелинизације. Такође су примећени знаци селективне фасцикуларне дегенерације при чему описане промене мијелинских

влакана нису биле подједнако присутне на пресеку нерва, већ су у појединим фасцикулусима биле израженије. Честе су васкуларне абнормалности ендонеуријумских крвних судова са задебљањем, оклузијом и субендотелним депозитима. Анализом живаца старије старосне групе оболелих од ПВБ стиче се утисак смањеног присуства мијелинских влакана у односу на контролне испитанике. Аксонска атрофија, сегментна демиелинизација и ремиелинизација су ређе присутне без јасне фокалне или мултифокалне локализације (Слика 5.17.).



Слика 5.16. Ендонеуријум суралног нерва у средњој (А) и најстаријој (Б) старосној групи испитаника са дијабетесом мелитусом. Ма – мијелинизовани аксон. Трихромно бојење по Масону, увећање 800×.



Слика 5.17. Ендонеуријум суралног нерва у средњој (А) и најстаријој (Б) старосној групи испитаника са ПВБ. Ма – мијелинизовани аксон. Трихромно бојење по Масону, увећање 800×.

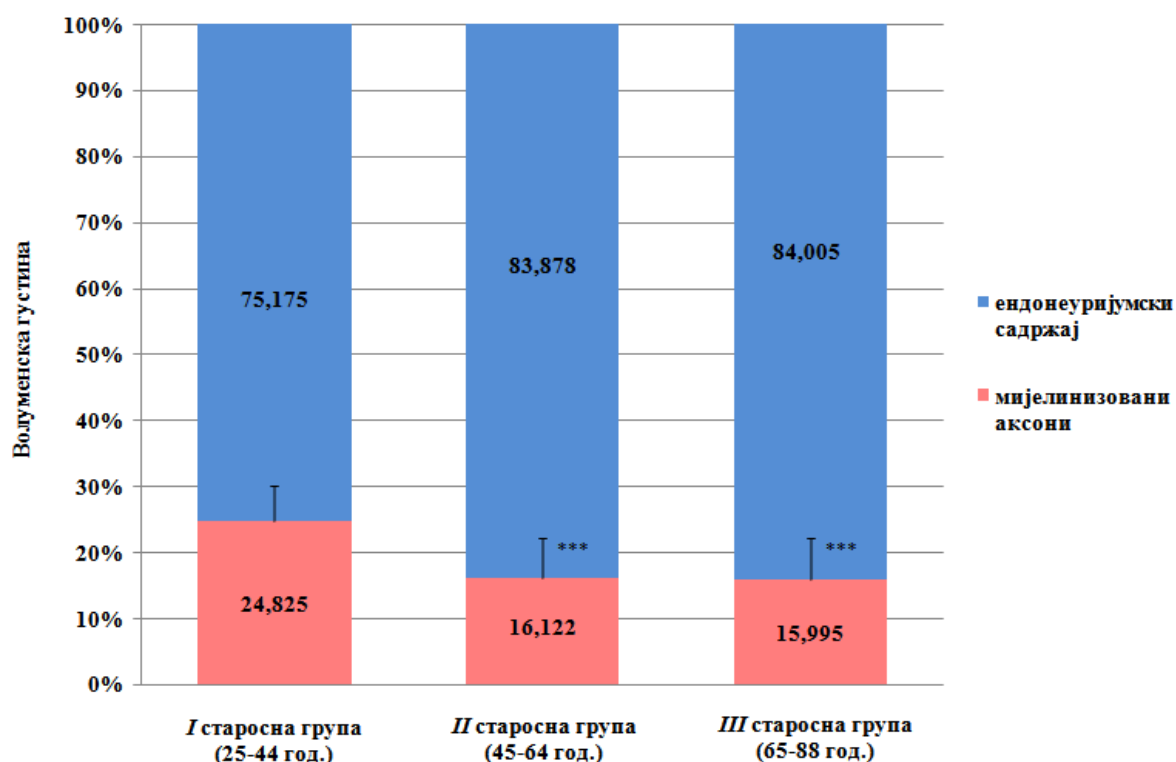
5.3.3. Морфометријска анализа волуменске густине мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја суралног нерва са старењем

Највиша просечна вредност волуменске густине мијелинизованих аксона у ендонеуријуму суралног нерва измерена је у *I* старосној групи ($24,825 \pm 5,250\%$), док је у *II* и *III* била статистички значајно мања ($16,122 \pm 6,148\%$; $15,995 \pm 6,243\%$; $p < 0,001$) у односу на најмлађу групу (Табела 10, Графикон 9).

Табела 10. Просечне вредности волуменске густине мијелинизованих аксона (V_{Vma}) и ендонеуријумског садржаја (V_{Ven}) суралног нерва код испитаника различите старости

Старосна група	<i>N</i>	V_{Vma} (%)	V_{Ven} (%)
<i>I</i> (25-44 год.)	9	$24,825 \pm 5,250$	$75,175 \pm 5,250$
<i>II</i> (45-64 год.)	6	$16,122 \pm 6,148$ ***	$83,878 \pm 6,148$ ***
<i>III</i> (65-88 год.)	15	$15,995 \pm 6,243$ ***	$84,005 \pm 6,243$ ***

*** $p < 0,001$



Графикон 9. Просечне вредности волуменске густине мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја суралног нерва код испитаника различите старости

Количина везивног ткива измерена у најстаријој старосној групи ($84,005 \pm 6,243\%$), као и у средњој групи ($83,878 \pm 6,148\%$) била је значајно виша у односу на најмлађу ($75,175 \pm 5,250\%$), са значајношћу од $p < 0,001$ (Табела 10, Графикон 9).

5.3.4. Морфометријска анализа волуменске густине мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

Просечна волуменска густина мијелинизованих аксона код пацијената са дијабетесом средње старосне групе је износила $15,962 \pm 9,025\%$ што представља мањи пад у односу на контролне испитанике, док је код болесника с ПVB забележена незначајно већа вредност од $17,400 \pm 3,216\%$ (Табела 11). Заступљеност везивног ткива у ендонеуријуму дијабетичног суралног живца старости од 45 до 64 године ($84,138 \pm 9,025\%$) била је виша у односу на контролне испитанике исте старосне групе, без сигнификантности (Табела 11). Незначајан пад процента везивног ткива забележен је у групи испитаника с васкуларном болести ($82,600 \pm 3,216\%$).

Табела 11. Просечне вредности волуменске густине мијелинизованих аксона (V_{Vma}) и ендонеуријумског садржаја (V_{Ven}) суралног нерва код испитаника средње старосне групе, оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

Група испитаника (45-64 год.)	N	$V_{Vma} (\%)$	$V_{Ven} (\%)$
Контрола	6	$16,122 \pm 6,148$	$83,878 \pm 6,148$
Дијабетес	6	$15,962 \pm 9,025$	$84,138 \pm 9,025$
ПVB	6	$17,400 \pm 3,216$	$82,600 \pm 3,216$

У најстаријој старосној групи вредност волуменске густине мијелинизованих аксона код испитаника с дијабетесом била је значајно нижа у односу на контролне испитанике исте старосне групе ($14,224 \pm 3,800\%$; $p < 0,05$), као и на пацијенте с васкуларном болести ($11,331 \pm 3,475\%$; $p < 0,001$), што се види у Табели 12. Пораст

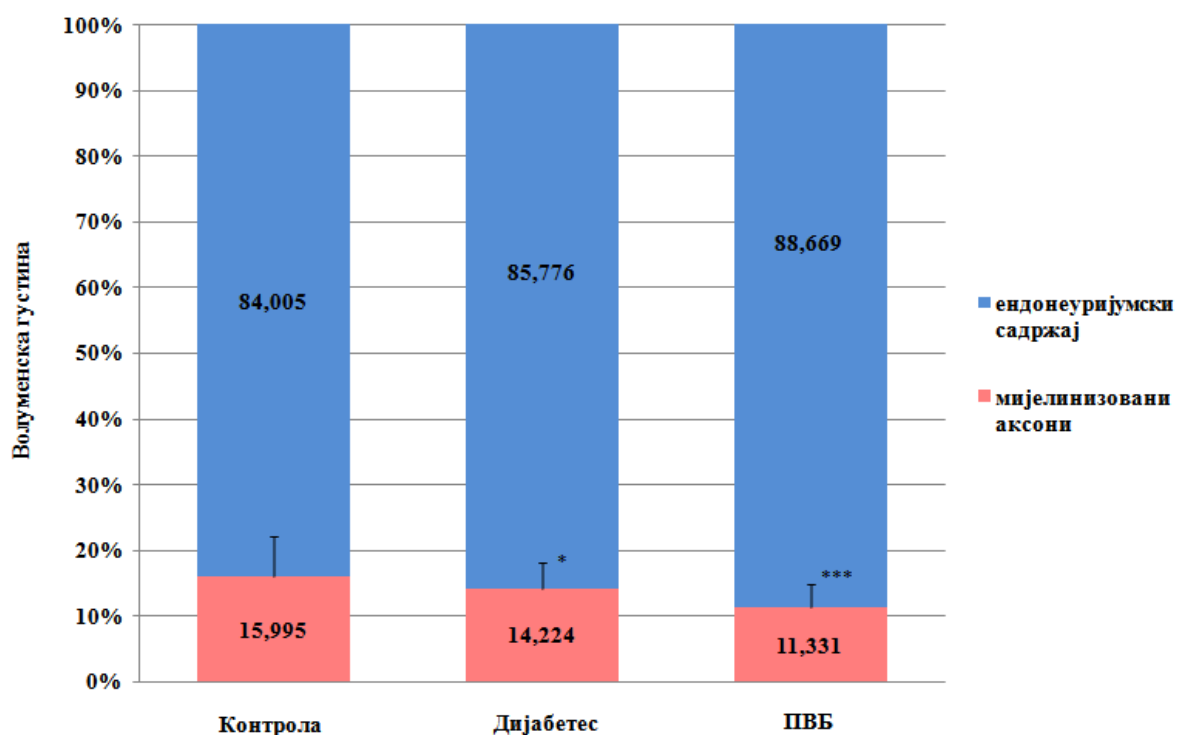
процента везивног ткива забележен у најстаријој групи пацијената с дијабетесом ($38,645 \pm 6,952\%$) и ПВБ ($28,977 \pm 7,875\%$) био је статистички значајан ($p < 0,001$) у поређењу са контролним испитаницима исте старосне доби (Табела 12, Графикон 10).

Табела 12. Просечне вредности волуменске густине мијелинизованих аксона (V_{Vma}) и ендонеуријумског садржаја (V_{Ven}) суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе, оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

Група испитаника (65-88 год.)	N	V_{Vma} (%)	V_{Ven} (%)
Контрола	15	$15,995 \pm 6,243$	$84,005 \pm 6,243$
Дијабетес	9	$14,224 \pm 3,800$ *	$85,776 \pm 3,800$ *
ПВБ	9	$11,331 \pm 3,475$ ***	$88,669 \pm 3,475$ ***

* $p < 0,5$

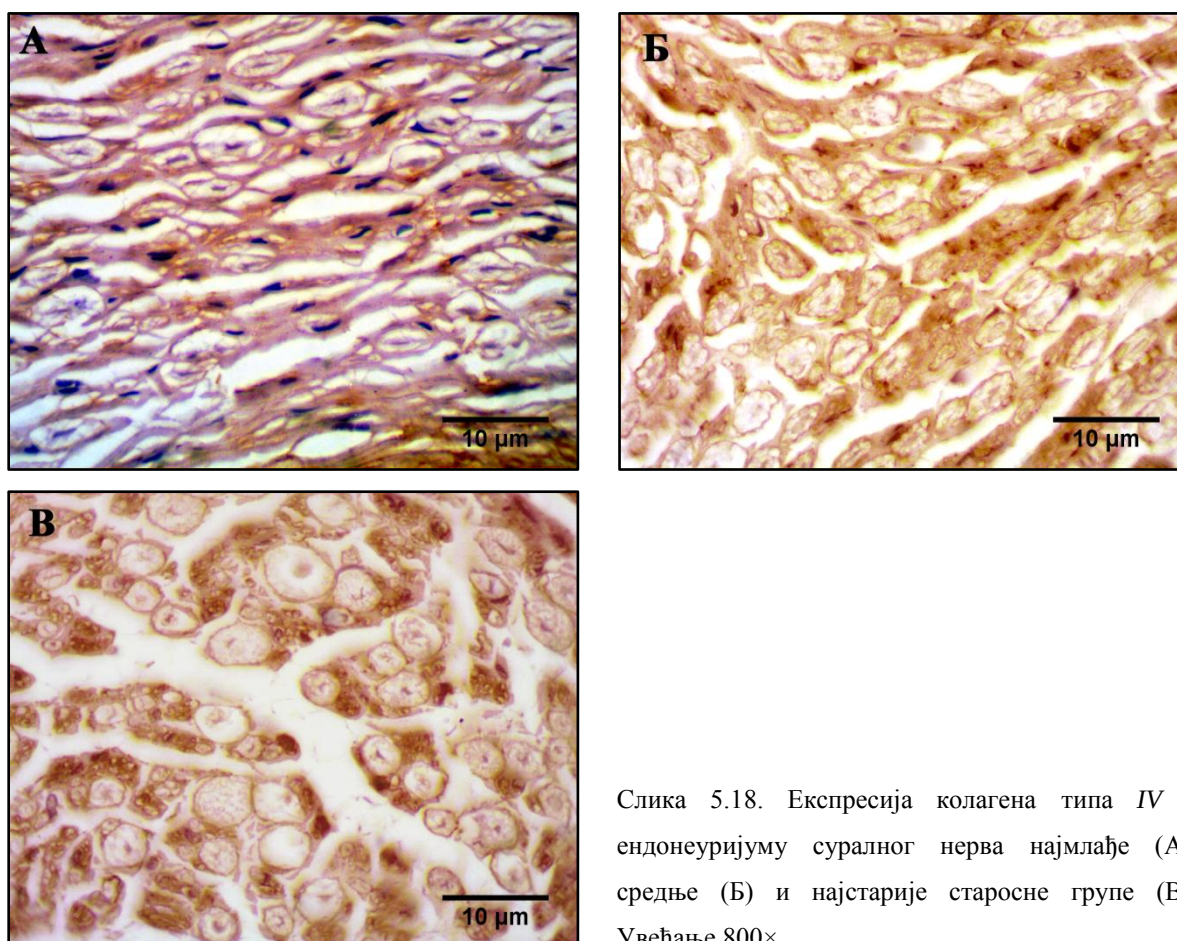
*** $p < 0,001$



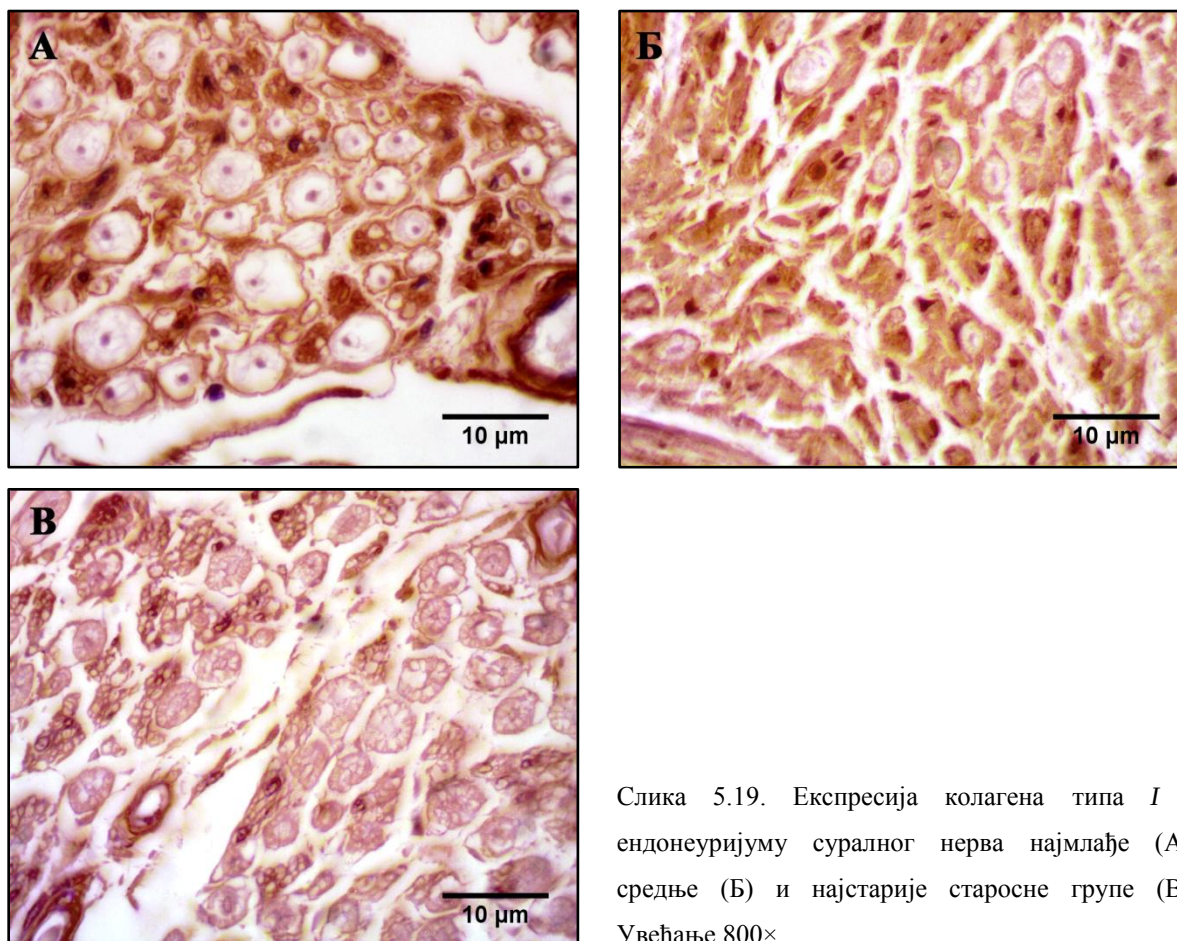
Графикон 10. Просечне вредности волуменске густине мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја суралног нерва код испитаника најстарије старосне групе (65-88 год.), оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

5.3.5. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа *IV*, *I* и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва са старењем

У ендонеуријуму анализираних нерава присутна је позитивна имунореактивност на колаген *I*, *IV* и ламинин. Имунореактивност колагена типа *IV* је већим делом локализована око аксона услед позитивне реакције базалне ламине Шванових ћелија, као и у зиду ендонеуријумских крвних судова услед позитивне реакције базалне ламине и перицита. Имунореактивност колагена типа *IV* код испитаника прве старосне групе је била слабија у виду танког прстена око малих и великих мијелинских влакана. Код испитаника друге старосне групе запажа се нешто јача имунореактивност око малих нервних влакана, док се код испитаника треће старосне групе уочава повећана имунореактивност и око малих, и око великих влакана (Слика 5.18.).

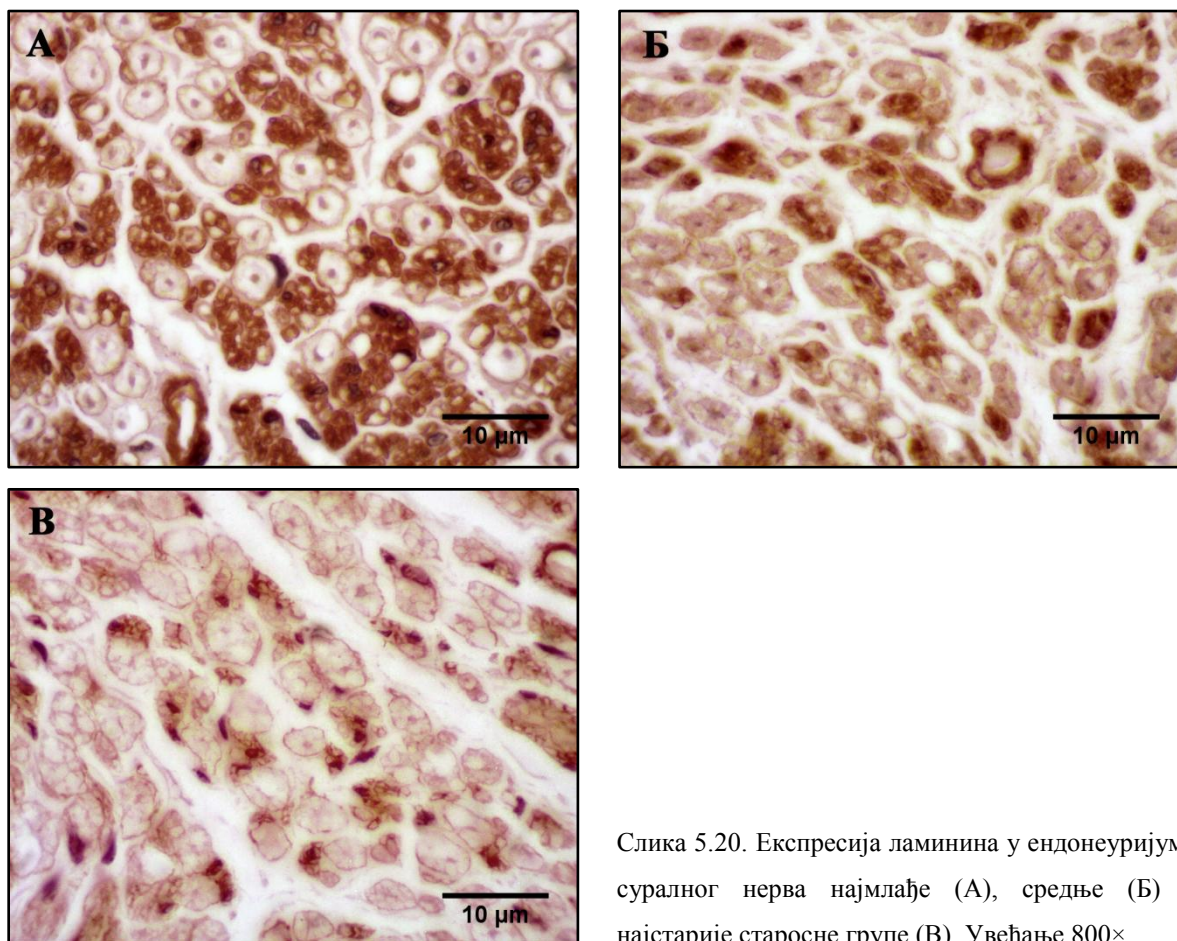


Слика 5.18. Експресија колагена типа *IV* у ендонеуријуму суралног нерва најмлађе (А), средње (Б) и најстарије старосне групе (В). Увећање 800×.



Слика 5.19. Експресија колагена типа *I* у ендонеуријуму суралног нерва најмлађе (А), средње (Б) и најстарије старосне групе (В). Увећање 800×.

Имунореактивност колагена типа *I* у ендонеуријуму суралног нерва је више дифузна, попут реактивности у епинеуријуму (Слика 5.19.). Уочена је позитивна реакција ендонеуријумских фибробласта, Шванових ћелија као и у туници медији ендонеуријумских крвних судова. Стиче се утисак да са годинама долази до опадања имунореактивности колагена типа *I* у ендонеуријуму испитиваних живаца. Имунореактивност ламинина у ендонеуријуму се такође детектује око нервних влакана и у зиду крвних судова. Код млађих нерава уочава се јача имунореактивност око влакана мањег калибра. Анализом испитиваних живаца различите старости стиче се утисак да са старењем долази до опадања имунореактивности ламинина у ендонеуријуму (Слика 5.20.).

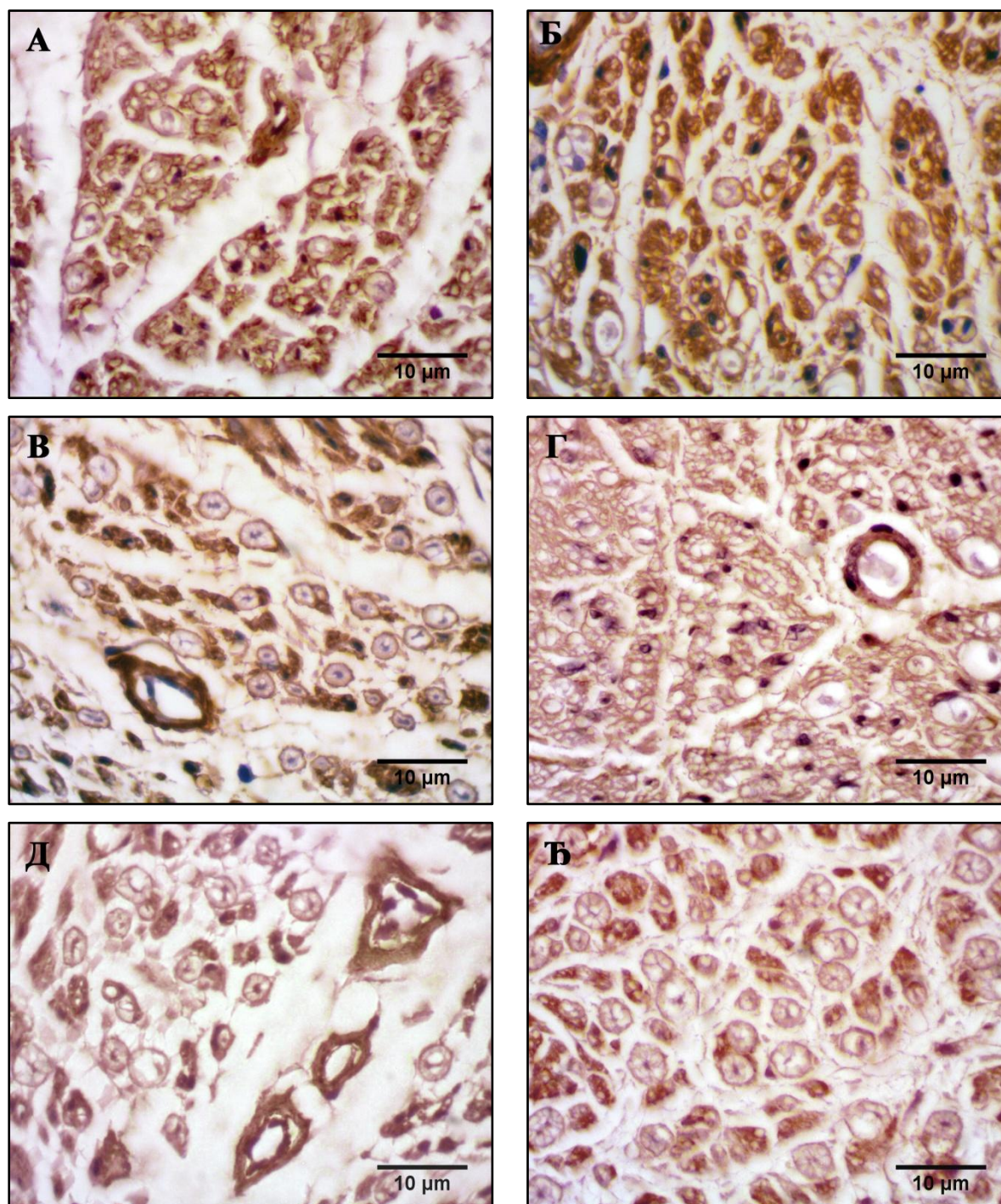


Слика 5.20. Експресија ламинина у ендонеуријуму суралног нерва најмлађе (А), средње (Б) и најстарије старосне групе (В). Увећање 800 $\times$.

5.3.6. Морфолошка анализа присуства и дистрибуције колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

У ендонеуријуму испитаника оболелих од дијабетеса и ПVB присутна је позитивна имунореактивност на колаген I, IV и ламинин. Локализација позитивне реакције испитиваних антитела у ендонеуријуму оболелих испитаника се није разликовала у односу на контролне испитанике обе старосне групе. Међутим, примећене су разлике у интензитету имунореактивности одређених антитела. Значајнија разлика је запажена код оболелих од дијабетеса код којих је у средњој старосној групи запажена слабија имунореактивност колагена типа I и ламинина, док је у старијој испитиваној групи запажена јача имунореактивност колагена IV (Слика 5.21.). Код испитаника оболелих од ПVB у односу на контролне испитанике стиче се утисак да је имунореактивност колагена типа IV слабија у односу на контролне испитанике и то у обе старосне групе. За разлику од претходног, разлика у

имунореактивности ламинина и колагена типа *I* у ендонеуријуму није запажена у односу на контролну групу.



Слика 5.21. Експресија колагена типа *IV* (А, Б), типа *I* (В, Г) и ламинина (Д, Ђ) у ендонеуријуму суралног нерва средње (А/В/Д) и најстарије старосне групе (Б/Г/Ђ) испитаника са дијабетесом (увећање 1000 $\times$).

5.3.7. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва са старењем

Имунореактивност колагена типа IV у ендонеуријуму суралног нерва израженија је са старењем. Волуменска густина колагена типа IV у најмлађој старосној групи износи $12,567 \pm 2,568\%$, у средњој старосној групи $15,313 \pm 4,106\%$, што представља статистички значајан пораст ($p < 0,001$), док је у најстаријој старосној групи значајно већа у односу на обе претходне групе ($19,385 \pm 3,846\%$; $p < 0,001$ према I и II групи) (Табела 13, Графикон 11). Присуство колагена типа I у ендонеуријуму суралног нерва у току старења карактерише се падом које је статистички значајно (Табела 13, Графикон 11). У односу на најмлађу групу ($16,272 \pm 4,138\%$), процентуална заступљеност колагена типа I код испитаника средње старосне групе била је значајно нижа ($14,232 \pm 4,996\%$; $p < 0,05$), док је у најстаријој групи пад био изражен како у односу на најмлађу групу ($6,981 \pm 3,169\%$; $p < 0,001$), тако и на средњу старосну групу ($p < 0,001$). Експресија ламинина у ендонеуријуму суралног нерва значајно опада са старењем, што се види у Табели 13 и на Графику 11. У I старосној групи процентуална заступљеност ламинина износи $16,503 \pm 4,678\%$, у II старосној групи $12,996 \pm 3,807\%$ ($p < 0,001$), а пад присуства у III старосној групи ($9,850 \pm 4,089\%$) статистички је значајан у односу на обе претходне групе ($p < 0,001$ према обема).

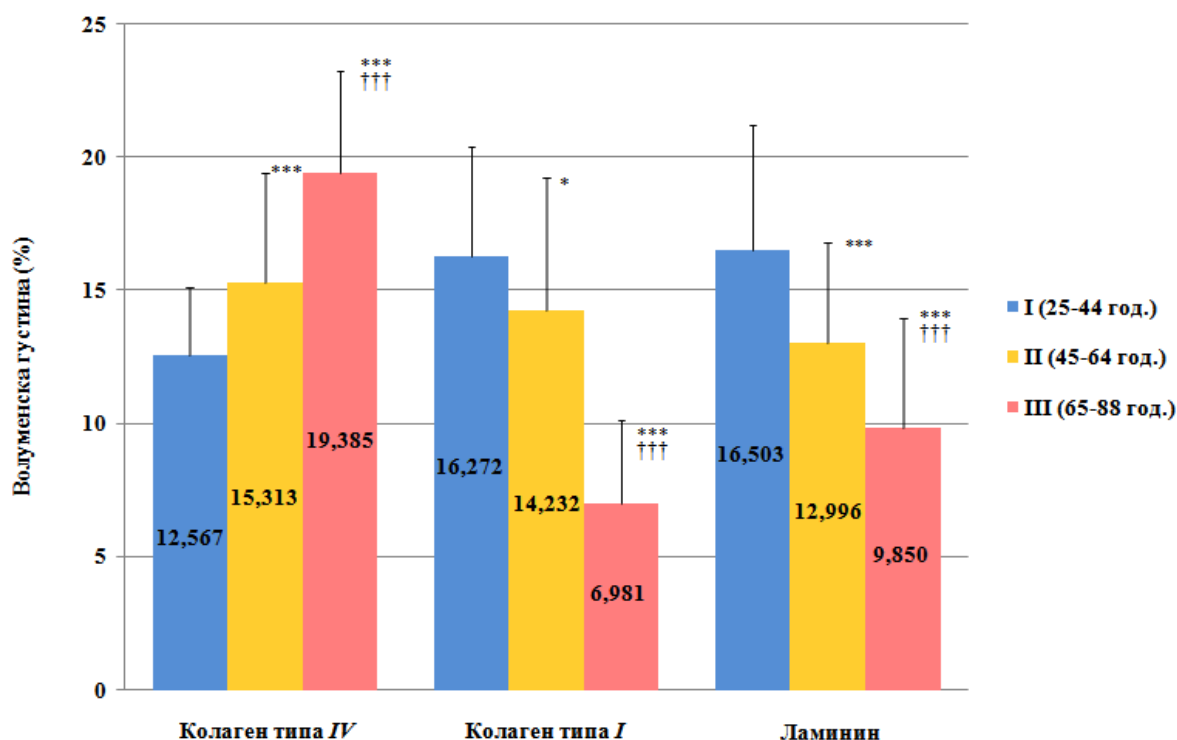
Табела 13. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV (V_{VCIV}), типа I (V_{VCI}) и ламинина (V_{VL}) у ендонеуријуму суралног нерва испитаника различите старости

Старосна група	N	V_{VCIV} (%)	V_{VCI} (%)	V_{VL} (%)
I (25-44 год.)	9	$12,567 \pm 2,568$	$16,272 \pm 4,138$	$16,503 \pm 4,678$
II (45-64 год.)	6	$15,313 \pm 4,106$ ***	$14,232 \pm 4,996$ *	$12,996 \pm 3,807$ ***
III (65-88 год.)	15	$19,385 \pm 3,846$ ***,†††	$6,981 \pm 3,169$ ***,†††	$9,850 \pm 4,089$ ***,†††

* $p < 0,05$ према I групи

*** $p < 0,001$ према I групи

††† $p < 0,001$ према II групи

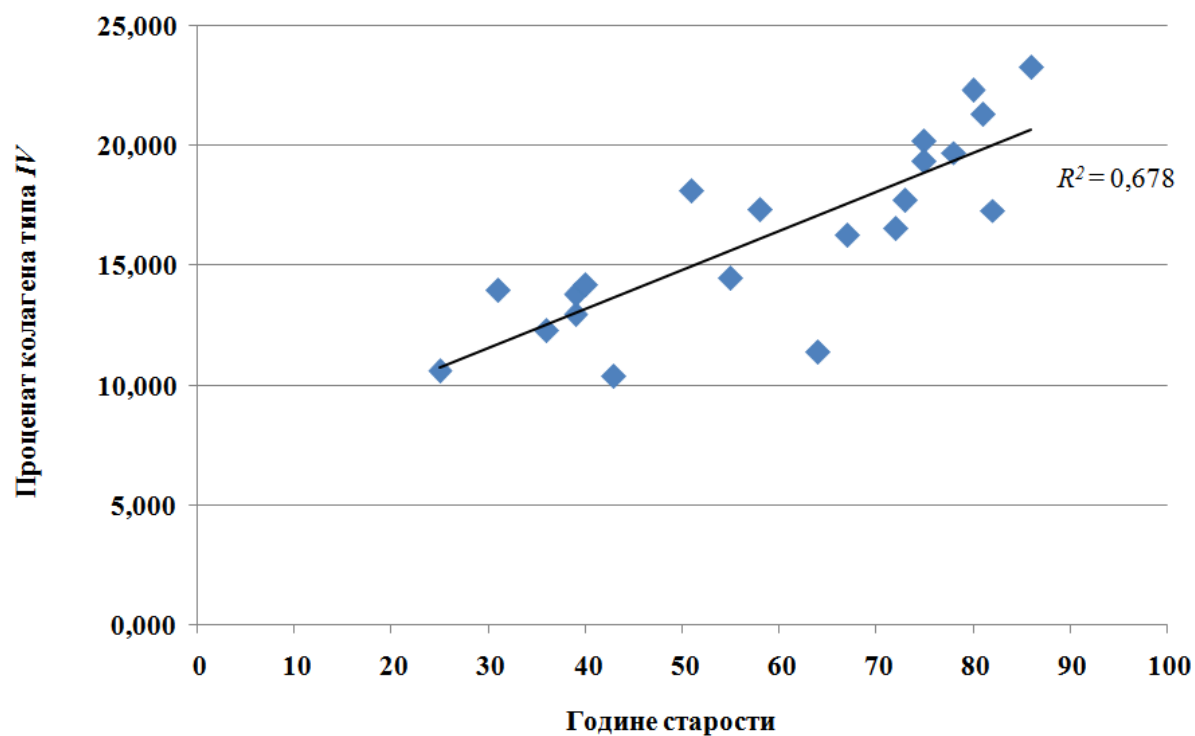


Графикон 11. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV, типа I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва испитаника различите старости

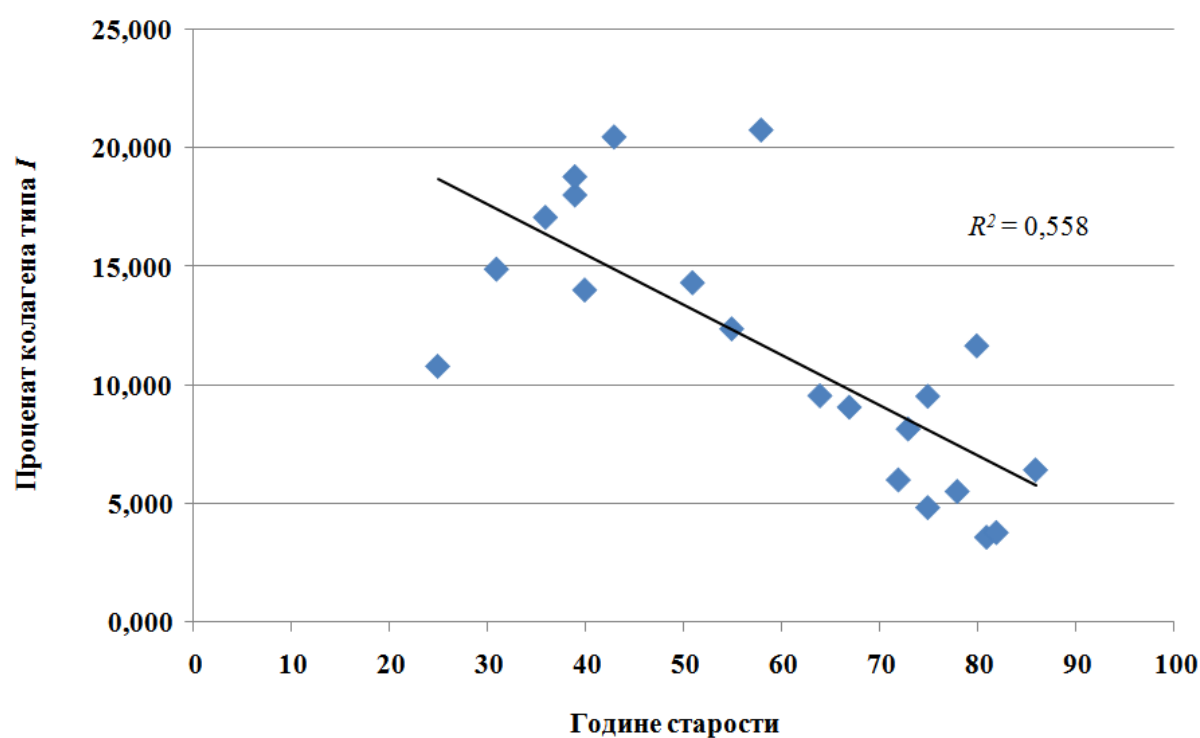
Корелациона веза између година старости и процентуалне заступљености колагена типа IV у ендонеуријуму показана је на Графикону 12. Коефицијент линеарне корелације износио је 0,823, коефицијент детерминације 0,678 уз значајност $p < 0,001$, што указује на постојање значајне позитивне корелације количине колагена типа IV са годинама старости.

На Графикону 13 приказана је значајна негативна корелација између присуства колагена типа I у ендонеуријуму суралног нерва и година старости. За добијени коефицијент линеарне корелације од -0,747 значајност износи $p < 0,001$, а вредност приказаног коефицијента детерминације као мере објашњеног варијабилитета износи 0,558.

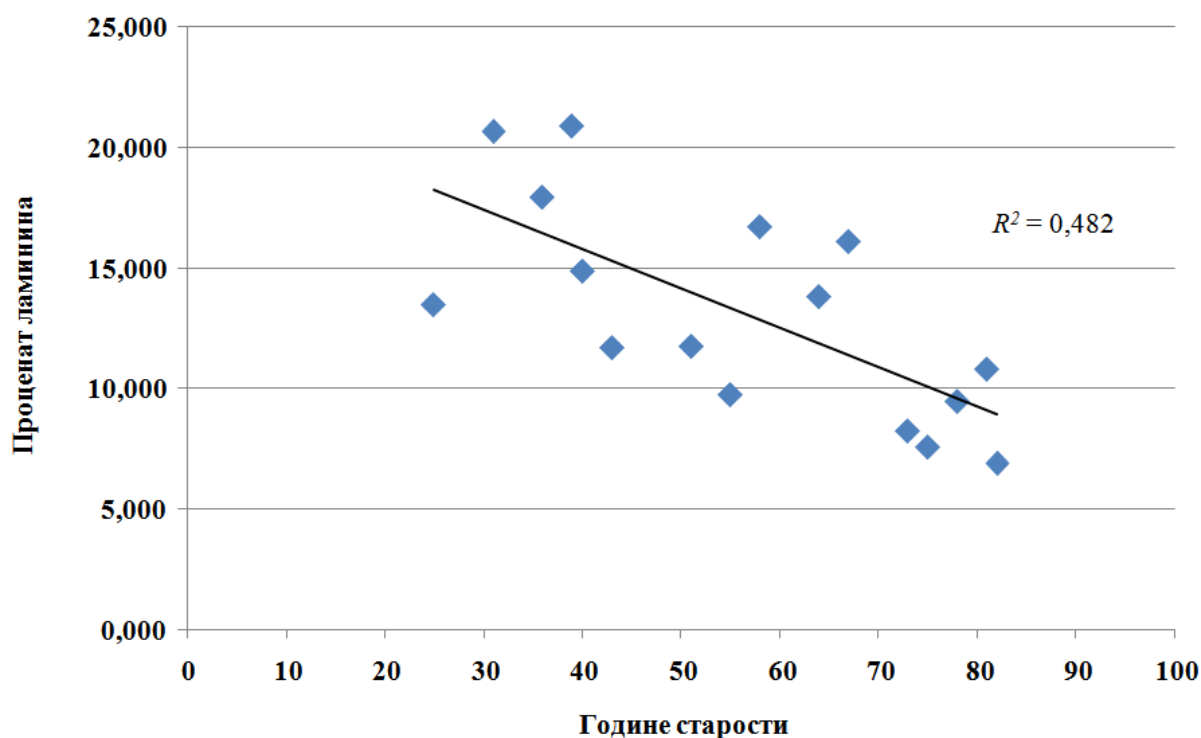
Код здравих испитаника три различите старосне групе количина ламинина значајно корелира са годинама старости. Коефицијент линеарне корелације је значајно негативан ($r = -0,695$; $p < 0,01$), а коефицијент детерминације износи 0,482, што показује да са старењем долази до смањења присуства ламинина у ендонеуријумском простору (Графикон 14).



Графикон 12. Корелациона анализа волуменске густине колагена типа IV у ендонеуријуму испитаника са годинама старости



Графикон 13. Корелациона анализа волуменске густине колагена типа I у ендонеуријуму испитаника са годинама старости



Графикон 14. Корелациона анализа волуменске густине ламинина у ендонеуријуму испитаника са годинама старости.

5.3.8. Морфометријска анализа волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва пацијената са дијабетесом и периферном васкуларном болести

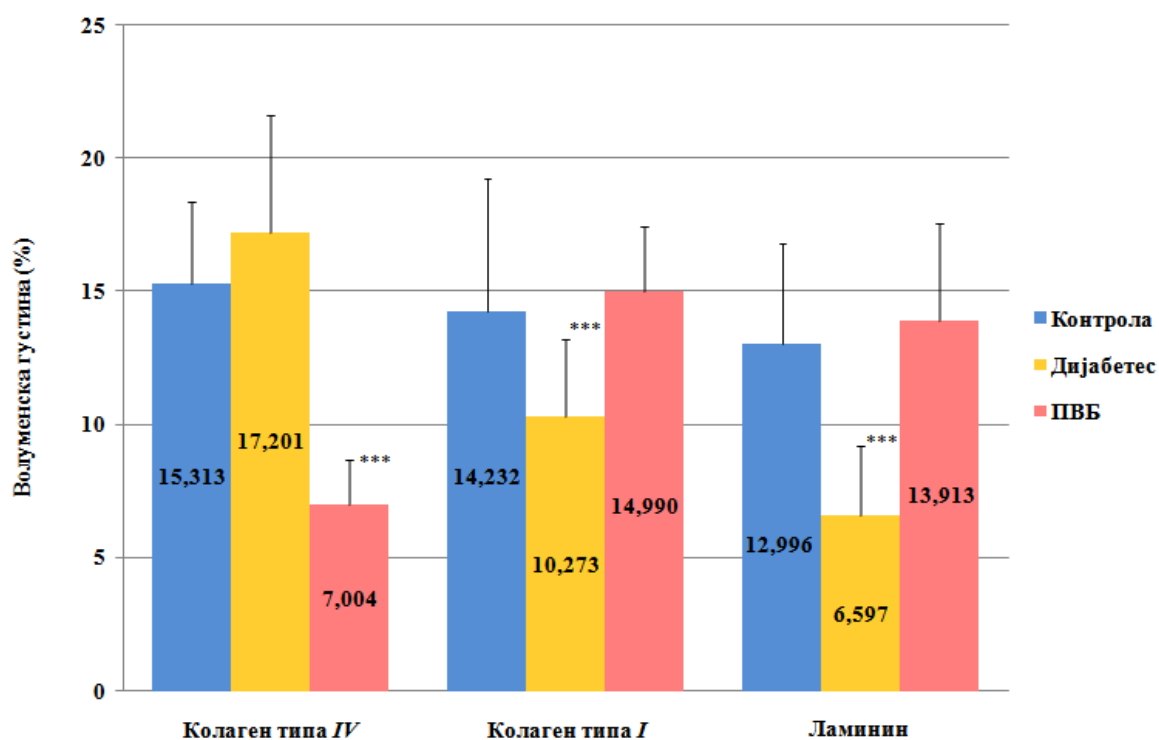
У ендонеуријуму суралног нерва испитаника са дијабетесом средње старосне групе забележен је пораст експресије колагена типа IV који није био значајан ($17,201 \pm 4,430\%$), за разлику од групе са ПVB где је забележено статистички значајно смањење присуства колагена типа IV ($7,004 \pm 1,678\%$; $p < 0,001$) (Табела 14, Графикон 15). На испитиваној површини ендонеуријума суралног нерва у средњој старосној групи процентуална заступљеност колагена типа I код испитаника са дијабетесом износила је $10,273 \pm 2,945\%$, што представља статистички значајно смањење у односу на контролне испитанике исте старосне групе ($p < 0,001$). Болесници с ПVB су показали благи пораст експресије колагена типа I ($14,990 \pm 2,449\%$), али без статистичке значајности (Табела 14, Графикон 15). У поређењу са контролним испитаницима средње старосне групе, код болесника са дијабетесом долази до статистички значајног смањења заступљености ламинина у ендонеуријумском простору ($6,597 \pm 2,622\%$;

$p<0,001$), док већа експресија у групи испитаника с ПVB (13,913±3,613%) није показала статистичку сигнификантност (Табела 14, Графикон 15).

Табела 14. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV ($V_{VCI\text{IV}}$), типа I (V_{VCI}) и ламинина (V_{VL}) у ендонеуријуму суралног нерва испитаника средње старосне групе, оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

Група испитаника (45-64 год.)	<i>N</i>	$V_{VCI\text{IV}}$ (%)	V_{VCI} (%)	V_{VL} (%)
Контрола	6	15,313±3,066	14,232±4,996	12,996±3,807
Дијабетес	6	17,201±4,430	10,273±2,945 ***	6,597±2,622 ***
ПVB	3	7,004±1,678 ***	14,990±2,449	13,913±3,613

*** $p<0,001$



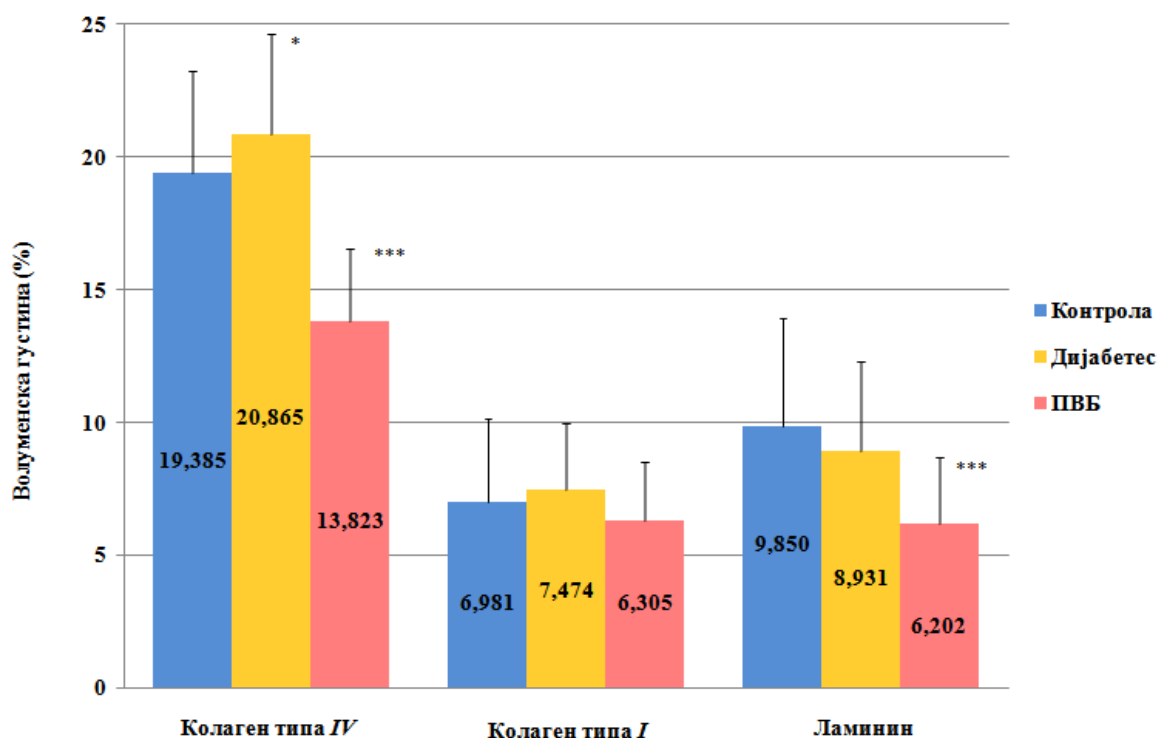
Графикон 15. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV, типа I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва испитаника средње старосне групе (45-64 год.), оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

Табела 15. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV (V_{VCIV}), типа I (V_{VCI}) и ламинина (V_{VL}) у ендонеуријуму суралног нерва испитаника најстарије старосне групе, оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

Група испитаника (65-88 год.)	N	V_{VCIV} (%)	V_{VCI} (%)	V_{VL} (%)
Контрола	15	19,385±3,846	6,981±3,169	9,850±4,089
Дијабетес	6	20,865±3,728 *	7,474±2,470	8,931±3,379
ПВБ	9	13,823±2,742 ***	6,305±2,208	6,202±2,487 ***

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$



Графикон 16. Просечне вредности волуменске густине колагена типа IV, I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва испитаника најстарије старосне групе (65-88 год.), оболелих од дијабетеса и периферне васкуларне болести

Код испитаника најстарије старосне групе примећена је повишена експресија колагена типа IV у ендонеуријуму пацијената са дијабетесом (20,865±3,728%; $p < 0,05$). Болесници са васкуларном болести, пак, показали су снижено присуство колагена типа

IV у ендонеуријуму у односу на здраве испитанике ($13,823 \pm 2,742\%$), које се одликује значајном статистичком разликом (Табела 15, Графикон 16). У Табели 15 дате су вредности присуства колагена типа *I* у ендонеуријуму испитаника најстарије старосне групе изражене у процентима, при чему се пацијенти с дијабетесом карактеришу нешто већим присуством колагена типа *I* ($7,474 \pm 2,470\%$), а болесници с васкуларном болести смањењем његове експресије ($6,305 \pm 2,208\%$). Ове промене, ипак, нису биле статистички сигнификантне. Код најстаријих болесника се бележи пад присуства ламинина у ендонеуријуму у односу на контролне испитанике, с тим што код пацијената с дијабетесом ($8,931 \pm 3,379\%$) он нема значајност, за разлику од групе с васкуларном болести ($6,202 \pm 2,487\%$; $p < 0,001$) (Табела 15, Графикон 16).

5. ДИСКУСИЈА

Повреде нерава које су са развојем индустрије и саобраћаја све чешће, упркос интензивном унапређењу оперативних техника и примени разних фармацеутских препарата, упорно показују низак степен регенерације и функционалног опоравка нерва. Савремена истраживања све већи значај придају стимулативном утицају микрооколине на процес регенерације нервних влакана. Последње деценије са развојем биоинжењеринга почиње се са производњом и применом артифицијалних нервних графтова, састављених од различитих компонената екстрацелуларног матрикса, у циљу што успешније регенерације и функционалног опоравка повређених нерава. Сходно значају и актуелности разумевања регенеративне способности нерава за циљ истраживања је постављена анализа старосних промена структуре везивноткивних омотача нерва.

Фасцикуларна структура нерва, која се огледа у присуству већег броја фасцикулуса одређене величине и распореда, представља чинилац биомеханичке отпорности нерва, заједно са количином епинеуријума. Нерв је свакодневно изложен различитим степенима истезања у току нормалних физичких активности. У литератури се наводе подаци да периферни нерв може толерисати истезање од 6 до 8 процената своје укупне дужине без морфолошких и структурних последица, док истезање преко 15 процената укупне дужине доводи до потпуног застоја интранеуралне циркулације (Dyck and Thomas, 1984; Vivo, 2004). Број фасцикулуса периферног нерва је варијабилан чинилац, али је битан у процени фасцикуларне структуре оних нерава који су подложни повредама или су важни у микрохирургији. Један од таквих је сурални нерв који се често користи за потребе нервног графта у неурохирургији. У овом истраживању број фасцикулуса суралног нерва здравих испитаника варирао је од 3 до 15. У литератури се наводе резултати анализа по којима се у суралном нерву број фасцикулуса креће од 9 до 14 (Ortiguela и сар., 1987), односно од 4 до 16 (Chentanez и сар., 2006). Просечан број фасцикулуса по старосним групама у овом истраживању није се значајно разликовао, крећући се од 6,83 у средњој до 8,2 у најстаријој групи. У истраживању спроведеном на хуманом материјалу, број фасцикулуса се није значајно разликовао између група различитих старости (млађа група: $9 \pm 3,2$; старија група: $7 \pm 2,5$) (Kundalić и сар., 2014a), а ни студија на анималним узорцима није потврдила

постојање разлике у броју фасцикулуса која корелира са годинама (*Campbell* и сар., 2013).

Заштита структуре и функције нерва, поред фасцикуларне грађе, зависи и од везивног ткива које улази у састав периферног нерва. Сматра се да епинеуријум, као најповршнији омотач и, следствено томе, најподложнији спољашњем притиску има улогу јастука који ублажава утицај компресивних сила на фасцикулусе, што последично делује поштедно на аксоне локализоване интрафасцикуларно (*Campbell* и сар., 2013). Епинеуријумски омотач се састоји првенствено од колагена, еластина и масног ткива. Претпоставља се да колагена влакна имају улогу у пружању отпорности и обезбеђивању издржљивости нерва на силе истезања (*Haftek*, 1970; *Liu* и сар., 1948), док се масном ткиву приписује функција амортизера и изолатора. Састав и количина епинеуријума су варијабилни дуж самог нерва, али су досадашња истраживања (*Sunderland*, 1965) показала да се може сматрати правилом да је епинеуријум присутнији на местима где живац долази у контакт са зглобом, тј. у случајевима постојања већег броја фасцикулуса мање величине. У студији рађеној на левом рекурентном ларингеалном нерву пса аутори су нашли значајно задебљање епинеуријума у односу на моторну грану тиббијалног живца које може бити резултат притиска који тај нерв трпи у грудном кошу приликом укрштања лука аорте и потенцијалних перисталтичких покрета једњака, али и у вратном делу услед покрета главе или ларинкса током гутања или говора (*Barkmeier*, 2000). Исти нерв је проучавала и Кембел са сар. (*Campbell* и сар., 2013) на узорцима прасади и младих свиња. Њихови резултати указују на већу површину епинеуријума на попречном пресеку нерва код младих свиња, који при том садржи и већу количину масног ткива, нарочито у вратном пределу. Ови резултати су у складу са истраживањем рађеним на хуманом исхијадичном нерву где су аутори показали раст адипозног ткива са старењем, који се могао уочити у интерфасцикуларном делу омотача (*Ugrenović* и сар., 2008). Налаз истраживања који је приказан у табели 1 не указује на постојање сигнификантне разлике у ареи епинеуријума суралног нерва испитаника различитих старосних група. Просечна површина епинеуријумског омотача износила је $1,308 \pm 0,421 \text{ mm}^2$ у најмлађој групи, показујући раст у средњој ($1,381 \pm 0,526 \text{ mm}^2$) и најстаријој старосној групи ($1,476 \pm 0,438 \text{ mm}^2$). Интер и епифасцикуларни део епинеуријумског омотача испитиваних узорака је добро развијен, при чему уз перинеуријум заузима ламеларну грађу, што може указати на заштитну функцију

епинеуријума. Имунохистохемијска анализа је показала значајну позитивну реакцију колагена типа *I* у епинеуријуму. Експресија колагена типа *I* је дифузна, присутна на сноповима влакана и епинеуријумским фиброцитима. У епинеуријуму суралног нерва регистровани су велики и мали крвни судови, при чему је у појединим случајевима средње и најстарије старосне групе уочено задебљање тунике интима артерија. У базалним ламинама крвних судова, глатким мишићним ћелијама тунике медије, перичитима и фибробластима тунике адвентиције већих крвних судова уочена је позитивна имунореактивност колагена типа *I*, *IV* и ламинина у све три старосне групе. Колаген типа *I* се презентује и око мањих крвних судова у виду концентрично постављених влакана. Присутни унилокуларни адипоцити остављају утисак веће заступљености код случајева најстарије групе, што је у сагласности са горе наведеним морфометријским резултатима других истраживања.

Као што је већ речено, епинеуријумски омотач, као најповршнији, штити унутрашњост нерва. Споља гледано, чак и оштећење епинеуријума неће довести до лезије нерва. Међутим, ако дође до прекида интегритета перинеуријумског слоја, оштећење живца ће бити видно. Значај перинеуријума је у томе што штити ендонеуријумски простор у коме се налазе нервна влакна. Неколико студија се бавило променама дебљине овог омотача у току старења. У студији на хуманом суралном нерву коју су спровели Џејкобс (*Jacobs*) и Лав (*Love*) (1985) резултати су показали задебљање базалне ламине перинеуријумског омотача које је било карактеристичније за спољашње слојеве омотача. С обзиром да су унутрашњи слојеви били поштеђени, аутори су то довели у везу са старосним променама. Као параметар процене дебљине перинеуријумског омотача Тохги (*Tohgi*) је промовисао *P* (перинеуријумски) индекс који је дефинисао као однос дебљине перинеуријума и пречника фасцикулуса (*Tohgi* и сар., 1977). У његовом истраживању анализирано је 79 случајева суралног нерва подељених у 8 старосних група. Иако је показивао тренд раста са годинама, *P* индекс је варирао међу испитаницима. У 68% случајева старијих од 60 година *P* индекс је био значајно већи у односу на млађе испитанике. Своје налазе су објаснили претпоставком да су површинска локација и последична хронична механичка траума одговорни за задебљање перинеуријумског омотача суралног нерва током година. На материјалу хуманог исхијадичног нерва такође је показан значајан пораст просечне дебљине перинеуријума у току живота, као и линеарни пораст волуменске запремине и ареала перинеуријума (*Ugrenović*, 2006).

Резултати приказани у табели 4 потврђују претходне налазе пораста запремине перинеуријумског омотача. Просечна вредност перинеуријумског индекса код најмлађих испитаника износила је $5,371 \pm 1,495$, да би у средњој старосној групи дошло до пораста вредности на $5,712 \pm 2,203$. Тренд раста са старењем је настављен у трећој групи где је забележена вредност P индекса од $6,314 \pm 1,866$. Статистички гледано, овај раст ипак није био значајан. Себаљос и сар. (Ceballos, 1999) су, проучавајући перинеуријум тибиналног нерва пацова, нашли да се ареа перинеуријума у току старења не мења, с изузетком најстарије групе где је било случајева са стањеним перинеуријумским омотачем, без статистичке значајности. У нашем претходном истраживању рађеном на 10 узорак хуманог суралног нерва подељених у две групе по старости (Kundalić и сар., 2014а), нашли смо да је дебљина перинеуријумског слоја изражена кроз P индекс показала статистички значајну тенденцију раста са старењем ($p < 0,05$). Претпоставили смо да је до ових промена дошло услед задебљања базалне мембране која улази у састав перинеуријумских ламела. Ранија истраживања су потврдила значај старења на повећање базалне мембране у бубрегу (Xi и сар., 1982; Anderson и Brenner, 1986), хороидном плексусу и семеним кесицама пацова (Serot и сар., 2001; Richardson и сар., 1995), васкуларној мембрани унутрашњег ува скочимиша (Thomopoulos и сар., 1997), церебралној микроциркулацији (Uspenskaia и сар., 2004) и ретини (Candiello и сар., 2010). Потоња студија Кандијела и сар. на ретини бавила се утицајем старосних промена на грађу и састав базалне ламине у интерној мембрани лимитанс ретине. Присуство колагена типа IV и ламинина, између осталих, испитивано је на 61 узорку старости од 20 до 80 и више година. Вестерн блот анализа узорка испитаника старости 88 година показала је значајно присуство колагена типа IV спрам ламинина који је доминантнији у феталној и присутнији у базалној мембрани млађих адулта. Оваква релација између протеина базалне мембране потврђена је анализом мембране лимитанс интерне испитаника старости од 40 до 50 година које су компарирани с узорцима испитаника старости преко 80 година.

Значајан тренд задебљања базалне мембране који смо објавили у претходно поменутом раду (Kundalić и сар., 2014а) указао нам је на потребу детаљнијег разјашњења овог феномена те је у овом истраживању анализирана структура перинеуријумске мембране кроз призму саставних компонената базалне мембране, колагена типа IV и ламинина, као и колагена типа I, као фибриларног протеина. Перинеуријумски омотач суралног нерва показао је статистички значајну експресију

колагена типа IV са старењем ($p < 0,001$), док је позитивност колагена типа I и ламинина показала значајно смањење са годинама ($p < 0,01$ за колаген типа I у средњој старосној групи; у осталим $p < 0,001$).

Корелацију између година и присуства колагена типа IV у хуманом исхијадичном нерву известили су и Угреновић и сар. (Ugrenović, 2011) који су предложили и R индекс као фактор предикције присуства колагена типа IV у перинеуријуму периферног нерва, иако слабије снаге у поређењу са годинама.

Студија Кандијела и сар. на хуманој ретини (2010) пружила је нове доказе о старосно узрокованој акумулацији колагена типа IV у базалним мембранама. Концентрација протеина базалне мембране која је нађена у феталној мембрани лимитанс интерни веома је висока спрема нивоа у периоду од две године након рођења, што указује да се ови протеини синтетишу до раног постпарталног периода када се њихова продукција умањује на значајно нижи степен. Ово је и разумљиво, јер би константан раст синтезе протеина базалне ламине убрзо довео до значајног задебљања ЕЦМ које би у оку компромитовало транспарентност оптичког апарата, а у нерву пропустљивост перинеуријумске мембране и баланс ендонеуријумске хомеостазе. Већ смо споменули да је ламинин кључан у раним фазама развића за формирање базалне мембране, док је колаген типа IV, као конституент касније фазе, битан за одржавање структуре базалне ламине. Ова чињеница, уз податак да се колагени спорије разграђују од неколагених протеина базалне мембране (Bishop, 2003), може објаснити његову појачану експресију код старијих особа.

Познато је да ниво колагена зависи од деликатне регулације синтезе и деградације, тако да појачана синтеза или успорена разградња могу утицати на размере депоновања колагена (Arthur, 1990). Већи део новонасталих колагена бива брзо разграђена што првенствено зависи од матриксних металопротеиназа (ММП), породице ензима зависних од цинка који имају способност разградње протеина који улазе у састав ЕЦМ. Активност ових ензима у физиолошким условима на нивоу експресије или инхибиције регулишу ткивни инхибитори металопротеиназа (ТИМП) (Angel и сар., 1987; Brinckerhoff и сар., 1986; Herron и сар., 1986). Дуготрајне измене једног од ових корака могу довести до накупљања колагена у паренхиму (Ebihara и сар., 2000; Iyer и сар., 1999). Сама природа ММП у старењу није толико испитивана колико њихова физиолошка улога у развоју, иако је катаболизам колагена директно зависан од ових ензима. Каталитичка активност ММП је показана, рецимо, у студији

на плућном ткиву које је показало њихову улогу у формирању и обликовању бронхијалних грана, хомеостази и репарацији (*Parks и Shapiro, 2001*). Стога се с правом сматра да постоји одговорност ММП за промет и разградњу протеина везивног ткива, а сама њихова активност је уско повезана с процесима активације и/или протеолитичке разградње унутар матрикса, тако да било какав испад у каскади овог деликатног механизма може за исход имати увећану акумулацију или деградацију ЕЦМ (*Steward, 1999; Tierney и сар., 1999*).

У литератури нема много радова који су проучавали активност ММП у ЕЦМ периферног нерва са старењем те су нарочито занимљиви резултати новијег истраживања бразилских научника које је за циљ имало увид у однос између ензимске активности ММП-2 и ММП-9, и грађе ЕЦМ у исхијадичном нерву пацова у току старења (*Esquisatto и сар., 2014*). Резултати денситометрије указали су на више вредности три изоформе ММП-2 и активне изоформе ММП-9 код пацова старих 180 и 730 дана у поређењу с млађима, старим 30 дана. Анализа ултраструктуре нерва на нивоу перинеуријума показала је смањење дијаметра овог омотача у најстаријој групи животиња, што је било праћено и сниженом количином колагених влакана, доказаном морфометријским испитивањем. Код старијих животиња може доћи до повећане разградње ЕЦМ услед појачаног дејства ММП што за последицу може довести до акумулације микрооштећења карактеристичних за испитиване животиње старијег доба. Резултати који указују на раст активности ових ензима могу се повезати са ткивним ремоделирањем које прати старосне промене. Према Ла Флеру и сар. (*La Fleur, 1996*) ММП-2 и ММП-9 носе потенцијал за модификацију састава базалне мембране преко разградње колагена типа IV. Поред своје основне функције као гелатиназе, ММП-2 може разградити и интактне молекуле колагена захваљујући својој способности везивања за троструки хеликс колагена типа I (*Aimes и Quigley, 1995*). Стога се повишен степен разградње денатурираних колагена, тј. гелатина, који је опажен код старијих животиња може довести у везу и са повећаном деградацијом претежно перинеуријумских колагених влакана (*Clutterback и сар., 2010*). Коришћене методе и добијени резултати бразилске студије ипак не упућују на прецизнији састав и тип колагена који подлеже разградњи и који је одговоран за смањење перинеуријумског омотача, а наведени подаци из литературе делимично потврђују наше налазе везане за колаген типа I.

Смањена експресија колагена типа *I* доказана је и у природно остарелој кожи. Као један од узрока, Варани и сар. (Varani, 2006) нашли су у старењу ћелијских фибробласта, док су ранија истраживања показала да постоји и пораст активности ММП у старијој кожи у односу на млађу, како у ћелијским културама (Bizot-Foulon и сар., 1995; Ricciarelli и сар., 1999), тако и у интактној кожи (Varani и сар., 2000). Ензимска разградња колагена није једини патофизиолошки механизам за промене у остарелој кожи, већ и смањена способност репарације оштећеног колагена синтезом новог материјала. Поред споменутог старења фибробласта, закључено је да и фрагменти деградираног колагена могу ометати ефикасну продукцију колагена (Varani и сар., 2002; Fligiel и сар., 2003).

Раније студије извођене на животињама показале су повећање колагена у артеријском зиду са старењем (Cox, 1983; Cox и Detweiler, 1988; Bruel и Oxlund, 1996), али будући да су за материјал коришћени крвни судови пацова и хртова, Ђу и сар. (Qiu, 2007) су претпоставили да би могле постојати значајне дискрепанције у резултатима између различитих врста те су спровели истраживање на аортама мајмуна, као приматима, и показали да су старосне промене у зиду аорте праћене падом експресије колагена типа *I* и *III*.

За разлику од наведеног, Калабрези и сар. (Calabresi, 2007) су нашли да је експресија колагена типа *I* била повећана на нивоу митохондријалне РНК и протеина у току старења, док је с друге стране ниво митохондријалне РНК за колаген типа *III* остао исти упркос повећаном експримирању протеина. Сличне резултате су на узорку јетре у старењу нашли и Гаљано и сар. (Gagliano, 2007). Претпоставка је да појава посттранслационих модификација и нарушена равнотежа између синтезе и разградње могу бити фактор који ремети механизме регулације метаболизма ових протеина (Calabresi и сар., 2007). Такође, Калабрези и сар. су чињеницом да је колаген типа *I* знатно присутнији у плућима спрема колагену типа *III* објаснили разлику у резултатима експресије ова два протеина, што би у случају базалне мембране перинеуријума превагнуло на страну колагена типа *IV* као главног структурног мембранског протеина у поређењу са колагеном типа *I*, као фибриларним протеином.

Ламинин, као главни конституент базалне мембране, кључан је од ране фазе њеног формирања за интегритет њене структуре и за ћелијску поларизацију, што има последичне ефекте на ћелијско преживљавање и ткивну организацију (Li и сар., 2003). Бројне су студије показале да са годинама долази до задебљања базалне мембране, што

је приписивано на рачун њених саставних делова, међутим прецизни механизми нису много проучавани. Тако су Ричардсон и сар. (Richardson, 1995) испитивали експресију гена за ламинин, колаген типа IV, хепаран сулфат и фибронектин у базалној мембрани тестиса у току старења и њихову потенцијалну одговорност за накупљање протеина и увећање базалне мембране. Нивои митохондријалне РНК за α -ланце ламинина и за колаген типа IV снижавали су се са годинама. Иако је то указивало на чињеницу да повећана синтеза ових протеина није одговорна за задебљање базалне мембране, претпоставили су и могућу транзиторну појачану експресију у хроничном току старења која није могла бити регистрована. Као једно од објашњења понуђена је и смањена разградња, односно ремоделација базалне мембране, међутим подаци о појачаној активности ММП у старењу, које смо и ми раније навели, негирали су ту могућност.

Ову су недоумицу пробали да разреше у студији на узорку бубрега мишева где су испитивани временски и просторни обрасци развоја гломеруларне базалне мембране у контексту садржаја ламинина и колагена типа IV. Резултати су показали да су биосинтезе ова два протеина раздвојене те су вероватно одређене различитим молекуларним механизмима. Сходно томе, може се закључити и да је уградња, као и уклањање ових протеина из базалне мембране посредовано другачијим контролним процесима, али је извесно да постоји координација између њих која осигурава нормално уобличавање мембране (Abrahamson и сар., 2013).

На узорку перонеалних нерава старијих пацова Ковачич и сар. (Kovačić, 2010) забележили су за 33 до 50% снижене нивое полипептида ламинина у поређењу с млађим пацовима. Налази из литературе показују да је ламинин, попут других нерастворљивих компоненти ЕЦМ, одговоран за промоцију аксонског раста сензитивних неурона *in vitro* (Millaruelo и сар., 1988; Tucker и сар., 2006), као и за регенерацију у исхијадичном нерву пацова *in vivo* (Wang и сар., 1992). Познато је и да старосне промене ЕЦМ снижавају сензитивни одговор у церебралним крвним судовима пацова (Gavazzi и сар., 1995, 1996). Из наведеног можемо претпоставити да су старосне алтерације саставних делова ЕЦМ периферних нервних путева укључене као важан фактор у снижену способност аксона сензитивних живаца за колатерално ницање, како у нервним графтовима, тако и у кожи (Kovačić и сар., 2010).

Функционални дефицити нерава условљени старењем могу бити последица структурних и биохемијских оштећења нервних влакана, тј. њихове дегенерације, која не бивају залечена услед смањеног капацитета механизма задужених за репарацију и

регенерацију (Ceballos и сар., 1999). У литератури се наводе различити ступњеви смањења броја и густине мијелинизованих и немијелинизованих нервних влакана у више анималних типова периферних живаца у току старења (Azcoitia и сар., 2003; Jeronimo и сар., 2008; Verdu и сар., 2000). Досад је познато да остарели мијелинизовани аксони подлежу атрофији и променама облика, док сам мијелински омотач трпи различите промене по типу балонирања, расцепа, инвагинације, редупликације и ремиелинације (Melcangi и сар., 2000; Peters, 2002). Неколико клиничких студија је дошло до резултата који указују на директну везу између старења и смањења брзине и степена функционалног опоравка периферног живца након лезије (Ceballos и сар., 1999; Verdu и сар., 2000). Старосне промене које могу компромитовати регенерацију оштећених аксона и колатерално ницање неоштећених влакана препознате су као смањено преживљавање старих неурона, смањена регенерација и капацитет ницања старих неурона, снижен одзив старих регенеришућих и ничућих аксона на неуротрофичке факторе, као и алтерације у формирању периферних нервних путева потребних за вођење регенеришућих и ничућих влакана, односно у самим органима које ови аксони снабдевају (Kovačić и сар., 2009). Покушаји разјашњења појаве да остарели неурони немају капацитет регенерације попут млађих указали су на потребу истраживања старосних промена у окружењу конуса раста аксона. Чанг и сар. су проучавајући инервацију хумане коже екстремитета нашли смањену густину интраепидермалних нервних влакана у групи испитаника преко 60 година у поређењу са млађима (Chang и сар., 2004). Корелирани са годинама, ови налази су такође показали значајност. У претходно објављеном истраживању такође смо анализирали волуменску густину мијелинизованих аксона и ендонеуријумског садржаја. Волуменска густина у млађој групи испитаника износила је $33,54 \pm 12,34\%$, што је било значајно више у односу на детериорацију забележену у старијој групи где је регистрована процентуална заступљеност од $14,31 \pm 8,61\%$ (Kundalić и сар., 2014a). Пропорционално наведеном, ендонеуријумски садржај се карактерише порастом са старењем, такође статистички значајним ($p < 0,05$).

Како је показано у овом истраживању, број мијелинских влакана у ендонеуријуму доминира код случајева најмлађе старосне групе, при чему се стиче утисак да су аксони и већег калибра у односу на аксоне старијих група. Нервна влакна у трећој старосној групи су мања, груписана у кластере, тањег мијелинског омотача. Заступљеност аксона са несразмерно дебелим мијелинским омотачем упућује на

постојање аксонске атрофије. Морфометријска анализа је показала статистички значајан пад волуменске густине мијелинизованих аксона у обе старије групе у односу на најмлађе испитанике. Упоредо са њима се мењао и ендонеуријумски садржај који је забележио сигнификантан раст у другој и трећој старосној групи ($p < 0,001$).

Што се тиче колагена, они имају важну улогу у развоју периферног нервног система, у процесима попут аксонског навођења, стварања синапси, завршне диференцијације мијелинизације Шванових ћелија, успостављања нормалне архитектуре нервног система. Такође, описана је и њихова улога у неким патолофизиолошким процесима (Hubert и сар., 2009). Колагена влакна су дијаметра 50-60 nm, и као таква мања су од оних у епинеуријумском омотачу (Bilbao и Schmidt, 2015). Ова су влакна лонгитудинално постављена и тесно пакована непосредно са спољашње стране базалне мембране Шванових ћелија које окружују мијелинизоване и делимично немијелинизоване аксоне. Мањи број ових влакана може имати косу или кружну оријентацију (Friede, 1978; Thomas, 1963). Остатак колагена је смештен у мање згуснутом аранжману. Он може бити у виду великих уздужних снопова или групи са делимично или потпуно окруженим Швановим ћелијама. Количина ових тесно пакованих групица расте са годинама и у неуропатским стањима. Гушћа концентрација колагених влакана запажена је и око ендонеуријумских крвних судова, као и испод унутрашњег слоја перинеуријума. Колаген типа I се најчешће може наћи у епинеуријуму и ендонеуријуму (Mustafa и Gamble, 1978; Lowry и сар., 1997; Bahcelioglu и сар., 2008). За разлику од њега, колаген типа IV је градивни елемент базалне мембране и даје подршку регенерацији нерва (Hubert и сар., 2009; Koopmans и сар., 2009). Колагене у периферном нервном систему производе како Шванове ћелије, тако и фибробласти (Bahcelioglu и сар., 2008; Koopmans и сар., 2009). Базалну мембрану Шванових ћелија, поред колагена типа IV, чине и ламинин, тенасцин и фибронектин. Колаген типа IV и ламинин се као саставни делови базалне ламине могу наћи још и у перинеуријумским и ендотелним ћелијама, перицитима и цитоплазми фибробласта (Lorimier и сар., 1992).

Ранија схватања су посматрала ЕЦМ као статичну структуру која пружа подршку, омогућава раздвајање и филтрацију у ткивима. Новија истраживања су предложила шири распон функција, након опсежних проучавања интеракција између протеина ЕЦМ, попут колагена, ламинина, тенасцина, нидогена и протеогликана, и рецептора ћелијске мембране (Koopmans и сар., 2009). Ове интеракције могу

активирати интерцелуларне сигнале и контролисати ћелијске процесе, као што су миграција, диференцијација и преживљавање (Aszodi и сар., 2006). Аксони који се развијају у потрази за циљем издужују се ка одговарајућем екстрацелуларном супстрату који може подржати њихов даљи раст (Hubert и сар., 2009). Како је детектовано у овом истраживању, присутан је значајан раст колагена типа IV удружен са значајним падом имунореактивности колагена типа I и ламинина у ендонеуријуму суралног нерва у току процеса старења ($p < 0,05$ за колаген типа I у средњој старосној групи; у осталим $p < 0,001$).

Лоримје и сар. (Lorimier, 1992) спровели су анализу ултраструктурне локализације колагена типа I, III и IV, ламинина и фибронектина у сва три везивноткивна омотача нормалног нерва пацова. Снажну позитивну реакцију на ламинин, фибронектин и колаген типа IV регистровали су у зидовима крвних судова епинеуријумског и ендонеуријумског слоја. Што се тиче налаза у ендонеуријуму, садржај ЕЦМ карактерисао се заједничким присуством ламинина и колагена типа IV са фибронектином и колагеном типа I, при чему је интензивнија имунореактивност колагена типа IV и ламинина примећена око сваког нервних влакана. У нашем истраживању састава ендонеуријумског компартмента хуманог суралног нерва описали смо исту локализацију експресије колагена типа I, IV и ламинина у ендонеуријумском омотачу. Поред овога, запажено је да се са старењем јача имунореактивност колагена типа IV опажа око малих влакана средње старосне групе, док је у најстаријој групи она присутна и око великих аксона. Низак степен експресије ламинина се може уочити у виду танке прстенасте реакције око нервних влакана, а потврђен је и морфометријском анализом. У старијим групама испитаника колаген типа I се местимично примећује. Његово смањење такође значајно корелира са старењем. Подаци из доступне литературе потврђују утицај старосних промена на количину колагена типа IV у базалним мембранама крвних судова хуманог мозга (Uspenskaia и сар., 2004), крвних судова ока (Chen и Strickland, 2003), ува (Ishiyama и сар., 2009) и бубрежних гломерула (Anderson and Brenner, 1986). С друге стране, нашли смо податак да су само Бахчелиолу и сар. (Bahçelioğlu и сар., 2008) регистровали смањено присуство колагена типа IV у ендонеуријуму окуломоторног нерва пацова у току старења. Исти аутори су описали и смањену имунореактивност колагена типа I са старењем, што потврђује наше налазе.

Веза између старења и фиброзе и њихова сврха у развоју није очигледна на први поглед. Фиброзни одговор органа на оштећење је главни узрок дисфункције органа. Интерстицијална фиброза у бубрегу представља уобичајени пут ка развоју терминалне бубрежне инсуфицијенције (*Boor, 2010; Zeisberg, 2010*). Ова се фиброза може јавити и као карактеристика старења бубрега. Одликује се пролиферацијом и трансформацијом фибробласта у миофибробласте, депоновањем фибронектина, колагена типа *I* и *III* у интерстицијуму и смањеним бројем малих крвних судова. Претпоставља се да миофибробласти настају од реналних перицита, при чему долази до регресије перитубуларних капиlara (*Kida, 2011*). Они се одвајају од ендотелних ћелија у одговору на оштећење, мигрирају у интерстицијум и тамо се диферентују у миофибробласте. Стога праћење реналних перицита може бити веза за схватање релација између фиброзе, старења, губитка микроциркулације и развоја хроничне бубрежне инсуфицијенције (*Torres и Leof, 2011*). Концепт антагонистичке плејотропије претпоставља да генетске црте које су корисне до репродуктивног доба могу показати штетне ефекте касније у животу. Тако се и фиброза вероватно јавља у сврху преживљавања код раних кичмењака као одговор на повреде ткива, при чему се може закључити да старосне промене и фиброзне болести представљају цену те ране заштите генетског пула (*Torres и Leof, 2011*).

Хроничне неуропатије се карактеришу повећањем ендонеуријумског колагена. Фибробласти не-нервних ткива су окарактерисани као главни чиниоци у развоју фиброзе и оживљавању након повреде. Међу могућим кофакторима описани су *T* лимфоцити, мастоцити и продукти макрофага. Шванове ћелије могу продуковати колаген као део свог регенеративног одговора на оштећење (*Bilbao и Schmidt, 2015*), што је видљиво и у нашим резултатима.

Патолошке промене у ПVB зависе од дужине трајања болести. Код хронично измењених нерава пацијената са ПVB нађене су сегментална демиелинизација и ремиелинизација у високом степену (*Chopra and Hurwitz, 1967a; Eames and Lange, 1967*). Имс и Ланг (1967) су у својој студији открили и аксонску дегенерацију, нормалан изглед већине немијелинизованих влакана, задебљање базалне мембране и пролиферацију ендотелних ћелија у ендонеуријумским капиларима, као и тромбозирани артериоле епинеуријума. Опречне налазе без приметног смањења мијелинизованих аксона у хроничној ПVB су објавили Чопра и Хурвиц (*Chopra и Hurwitz, 1969b*). Фаринон и сарадници (*Farinon и сар., 1984*) открили су патолошке

измене различите тежине, мада је од седам испитаника било четири дијабетичара. Сличну патологију нерава у ПVB, разнолику по типу и тежини, описали су Витал и сар. (Vital и сар., 1986). У студији на површним перонеалним нервима нашли су варијабилан губитак мијелинизованих аксона, изражену аксонску дегенерацију, незначајну сегменталну демиелинизацију и разноликост тежине оштећења немијелинизованих нервних влакана. Патолошки налаз биопсираних узорака суралног живца показао је аксонске дегенеративне и регенеративне промене без доказа о запаљењу (Bosboom и сар., 2001; Teunissen и сар., 2000). На ултраструктурном нивоу се може уочити задебљање базалне мембране ендонеуријумских крвних судова (Teunissen и сар., 2000), али је овај налаз неспецифичан (McKenzie и сар., 1999). Подвезивањем великих артерија доњих екстремитета код пацова регистроване су промене на дијаметру фасцикулуса који су били увећани у односу на контролу, и то на рачун унутрашњег слоја перинеуријумских ћелија које су биле увећане, отечене, с дисолуцијом митохондрија, разарањем плазмалеме и протеинским ексудатом у простору између дегенерисаних перинеуријумских ћелија. Као рана реакција на исхемију нађене су липидне капљице у више типова ћелија, укључујући перинеуријумске, ендонеуријумске и Шванове ћелије. Наведене промене на перинеуријумском омотачу се јављају на проксималном делу оштећеног нерва и представљају претходницу за касније, дисталне промене на финим влакнима ендонеуријума (Benstead и сар., 1989).

Резултати овог истраживања показали су да постоји задебљање перинеуријумске мембране које се огледа у значајном повећању *P* индекса у групи пацијената са ПVB, што смо показали и претходно објављеним резултатима (Kundalić и сар., 2014b). Пораст је статистички значајан у обе поређене старосне групе ($p < 0,05$). Потврду да се овај налаз може повезати са задебљањем базалне ламине јесте и сигнификантан скок количине колагена типа IV и ламинина у старијој групи пацијената са ПVB. Експресија ламинина наставља овај тренд присутан са значајношћу још у средњој старосној групи, док у том старосном рангу колаген типа IV није био од статистичког значаја. Тенденција раста имунореактивности колагена типа I забележена је у обе старосне групе болесника са ПVB, у односу на контролну групу.

У доступној литератури која презентује резултате истраживања неуропатских промена услед исхемије и васкуларних промена већина се односи на дијабетичне промене и секундарне васкуларне компликације, док ПVB као примарни узрок

исхемије и хипоксије није довољно испитана. Једна од експерименталних студија на пацовима је показала да након тридесетоминутне исхемије долази до скока у нивоу колагена типа IV, I и ТИМП-2 чија ниска концентрација помаже разградњу колагена од стране ММП, али чије више концентрације инхибирају настанак ензима и следствено доводе до повећања нивоа колагена који учествују у стварању ожиљног ткива (Anik и сар., 2011). Студија на ћелијској култури показала је статистички значајан раст митохондријалне РНК $\beta 2$ ланца ламинина у хипоксичним условима (Yoshida и сар., 2006), што је потврђено и каснијим испитивањима експресије ланца ламинина (Bao и сар., 2006). Генерално, на исхемијом и хипоксијом изазвана оштећења протеини екстрацелуларног матрикса реагују репарацијом и обновом базалне мембране те је очекиван њихов пораст у оваквим стањима. Међутим, тачан механизам настанка није довољно разјашњен и наши резултати указују да су промене у перинеуријуму код оболелих са алтерацијама на периферној васкуларној мрежи израженије него код дијабетесних пацијената у ендонеуријуму. Могући разлози за то могу бити постојање двојне васкуларизације периферног нерва, тј. спољашњег и унутрашњег система, који делују поштедно на аксоне у ендонеуријуму, затим проксимална локализација перинеуријума у односу на системску циркулацију где и настају васкуларне промене које су узрок исхемије и хипоксије, и напослетку као потенцијално објашњење могу бити микроангиопатске промене, карактеристичне за дијабетес, које захватају мање крвне судове присутне у ендонеуријумском компартменту.

Хил (Hill, 2004) и сар. у свом истраживању на пет суралних нерава пацијената са ПВБ нису нашли задебљање перинеуријумске базалне мембране на електронској микроскопији. Међутим, забележили су значајно мању густину мијелинизованих аксона у ендонеуријуму код пет пацијената са дијабетесом, што је у складу са нашим резултатом волуменске густине мијелинизованих аксона у ендонеуријуму дијабетичног суралног нерва где смо забележили пад у обе старосне групе, при чему је у старијој био сигнификантан. Консеквентни налаз бујања ендонеуријумског садржаја на рачун аксона смо потврдили и у објављеном раду (Kundalić и сар., 2014b). У свом каснијем истраживању Хил и сар. (Hill, 2009) су поредили имунореактивност ламинина и колагена типа IV унутар ендонеуријума и мада су забележили пораст у односу на контролну групу, он се статистички није разликовао. Сличан резултат смо и ми забележили у овом истраживању, када је колаген типа IV у питању, с тим што смо регистровали сигнификантност у најстаријој групи оболелих од дијабетеса ($p < 0,05$). У

литератури се могу наћи налази и других аутора који су такође показали повећану експресију колагена типа *IV* у ендонеуријуму дијабетичног нерва, као што су Бредли и сар. на хуманом материјалу (Bradley, 2000) и Муона са сар. (Muona, 1991) *in vitro*.

Занимљив поглед на улогу колагена типа *IV* у регенерацији нервног ткива дали су Штихел и сар. (Stichel, 1999). Они су поставили хипотезу да депозиција базалне мембране након лезије може спречавати раст аксона у ЦНС, што су испитивали на посткомисуралним влакнима форникса код пацова убризгавањем антитела на колаген типа *IV* или компетитивног инхибитора пролил-4-хидроксилазе, одговорне за повећано стварање колагена типа *IV*. Код животиња подвргнутих третману 6 дана након операције примећено је ницање аксона ка дисталном делу пресеченог нерва, за разлику од контролне, нетретиране групе где су аксони престали с растом на проксималном делу патрљка. Могуће објашњење за овај феномен, који је контрадикторан *in vitro* резултатима који базалној мембрани приписују омогућавање израстања ћелијских наставака, може бити да се *in vivo* базална ламина може поставити попречно у односу на место лезије за разлику од лабораторијских услова где су влакна постављена паралелно са базалном мембраном, а и сам њен молекуларни састав се може разликовати од услова у којима је настала (Stichel и сар., 1999). Значајна експресија колагена типа *IV* у ендонеуријуму коју смо ми забележили могла би, у складу с наведеном појавом, бити и узрок мање волуменске густине аксона коју смо са статистичком значајношћу такође забележили у најстаријој групи пацијената са дијабетесом.

Наши налази промене колагена типа *I* и ламинина у ендонеуријуму дијабетичног суралног нерва млађих испитаника воде, пак, у правцу значајно мање експресије ових протеина. Међу хемијске промене у базалној мембрани крвног суда у условима повишеног нивоа глукозе Хемат наводи раст колагена типа *IV* који је, између осталог, праћен смањеном количином ламинина (Hemat, 2004). Иако је ламинин познат по позитивном ефекту на регенерацију нервних влакана, његов раст није забележен ни у ранијој квалитативној студији Бредлија и сар. (Bradley, 2000). Резултате нашег истраживања бисмо могли повезати с налазом Салонена и сар. (Salonen, 1987) да хронична дегенерација води к атрофији Шванових ћелија, што се може огледати кроз смањену имунореактивност ламинина који је присутан у њиховим базалним ламинама.

Истраживање Харониса и сар. (Charonis, 1990) у *in vitro* условима повишене концентрације глукозе показало је поремећену способност ламинина за удруживање и

формирање 3D мрежа. Неензимско уграђивање молекула глукозе у ламинин довело је до драстичног смањења ламининских димера који се иначе нормално стварају приликом почетних фаза формирања овог протеина. Поред тога, процес гликозилације утицао је негативно и на способност ламинина да се организује у комплексе веће од димера.

Доказано је учешће хипергликемије као главног метаболичког поремећаја дијабетеса у усходној регулацији рецептора за неке од компонената базалне мембране, као што су колаген типа IV и фибронектин (Hill и Williams, 2002; Muona и Peltonen, 1994). Хипергликемија је одговорна за индукцију оксидативног стреса и полиолног пута. Високи нивои сорбитола и, следствено томе, фруктозе створене у полиолном путу у вези су са поремећеном регулацијом протеин киназе C и Na^+/K^+ -ATP-азе што води нервној дисфункцији (Tarr и сар., 2013). Вишак глукозе реагује с протеинима стварајући крајње продукте напредне гликације (AGE). Њихови примарни циљеви су протеини ЕЦМ, нарочито они у базалној мембрани, као што су колаген типа I, III, IV и VI, фибронектин и ламинин (Goh и Cooper, 2008; Nukada, 1996). Брзина акумулације AGE поспешена је хипергликемијом те су пронађени у разним органима, нпр. бубрегу, ретини, срцу или атеросклеротским плаковима (Goh и Cooper, 2008; Schmidt, 2008). Клиничке и експерименталне студије показале су повећање ендонеуријумског колагена, редупликацију базалних мембрана око ендонеуријумских капиlara, као и задебљање базалне мембране (Bradley, 1994; Yagihashi, 1997). Тубулин и неурофиламент у аксонима и мијелинском протеину Шванових ћелија могу се модификовати од стране AGE у нервним влакнима, док је показано да колаген, ламинин и фибронектин подлежу гликацији у базалној мембрани и ЕЦМ (Wada и Yagihashi, 2005). С друге стране, код пацијената са Шаркоовом неуроартропатијом, која се може јавити секундарно као последица дијабетичне неуропатије, показано је скраћење Ахилове тетиве за које је претпостављено да је консеквенца деструктивног дејства AGE на колагена влакна (Vinik и сар., 2008).

Колагени су у пракси нашли примену као биоматеријал за спровођење нервних влакана у току процеса регенерације након трауматских процеса у периферном нервном систему. Ови нервни водичи базирани на колагену се сада тако дизајнирају да својим неуротрофичким факторима које отпуштају стимулишу не само навођење, већ и раст аксона. Овакви колагенски водичи су направљени од колагена типа I (Whitlock и сар., 2009), нано сребра и колагена типа I (Ding и сар., 2010) и колагена типа I и III

(*Kijeńska* и сар., 2012). Наведени подаци указују да је колаген типа *I* одличан адхезивни супстрат за многе типове неурона (*Hubert*, 2009). Ламинин, као главни неколагени протеин базалне мембране, досад се показао као снажан стимулатор аксонског раста, неуронског преживљавања и деобе Шванових ћелија *in vitro* (*Kuecherer-Ehret* и сар., 1990). Каупила и сар. (*Kaupila*, 1993) су закључили да употреба ламининског графта у хирургији може бити корисна метода за клинички опоравак оштећених периферних нерава. Стога, иако се колагени не могу сматрати директно одговорним за неуспех регенеративног процеса, могли би се користити, путем њихове интеракције са инхибиторима аксонског раста, за индиректно спречавање или фаворизовање раста аксона (*Joosten* и сар., 2000). Раније је наведена употреба колагена типа *IV* као циљног молекула за терапијску интервенцију инјекцијом антитела на њега која је показала напредак у регенерацији након механичке трансекције посткомисуралног форникса адултног пацова (*Stichel* и сар., 1999). Формирање колагеног ожиљка је такође једна од појава у ПНС која може успорити опоравак нерва (*Atkins* и сар., 2006). Познато је да стварање ожиљка на месту коаптације омета раст ничућих аксона к одговарајућим дисталним фасцикулусима што успорава и ограничава процес регенерације нерва. Узевши све наведено у обзир, јасно је да постоји потреба за прецизним разумевањем равнотеже између корисних и штетних ефеката различитих типова колагена и ламинина у оштећеном нерву (*Hubert* и сар., 2009), а вероватно и других елементарних молекула екстрацелуларног матрикса.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата спроведеног истраживања, након морфолошке, морфометријске и имунохистохемијске анализе узорака хуманог суралног нерва, могу се извести следећи закључци:

1. Број, величина и распоред фасцикулуса суралног нерва не показују значајне промене током старења.
2. У току процеса старења не долази до значајног задебљања епинеуријумског омотача суралног нерва.
3. У епинеуријуму суралног нерва доминантно је присуство колагена типа *I*.
4. Са старењем не долази до значајног повећања перинеуријумског индекса, што указује да дебљина перинеуријума задржава позитивну корелацију са величином фасцикулуса.
5. У перинеуријуму доминантно је присуство колагена типа *IV* и ламинина који показују ламеларну дистрибуцију.
6. Са процесом старења долази до значајног ремоделирања испитиваних компонената екстрацелуларног матрикса у перинеуријуму са значајно повећаним присуством колагена типа *IV* и истовремено смањеним присуством колагена типа *I* и ламинина које може негативно утицати на функцију перинеуријума као дифузионе баријере.
7. У ендонеуријуму постоји дифузна позитивна реактивност колагена типа *I*, док су колаген типа *IV* и ламинин локализовани претежно око нервних влакана и крвних судова.
8. Старење је праћено значајном аксонском дегенерацијом и ендонеуријумском фиброзом.
9. Фиброза ендонеуријумског матрикса у току старења, праћена значајно повећаним присуством колагена типа *IV* и смањеним присуством колагена типа *I* и ламинина, утиче на смањење регенеративне способности нервних влакана.
10. У односу на сенилну неуропатију, код дијабетесне и васкуларне неуропатије детектоване су разлике у перинеуријумском омотачу и ендонеуријуму.

11. Већа дебљина перинеуријума код испитаника најстарије групе са дијабетесном неуропатијом може бити последица повећаног присуства колагена типа *I*.
12. Повећана дебљина перинеуријума код васкуларне неуропатије у обе старосне групе испитаника, у односу на сенилну неуропатију, може се објаснити повећаним присуством колагена типа *IV*, типа *I* и ламинина.
13. Код испитаника оболелих од дијабетесне и васкуларне неуропатије старости од 45 до 64 године не постоји значајно већи степен аксонске атрофије у односу на контролну групу.
14. У групи испитаника са дијабетесном неуропатијом старијих од 65 година постоји значајно већи степен аксонске дегенерације и ендонеуријумске фиброзе са повећаним присуством колагена типа *IV* у односу на контролне испитанике.
15. Код испитаника са васкуларном неуропатијом старијих од 65 година такође постоји већи степен аксонске дегенерације и ендонеуријумске фиброзе која није праћена повећаним присуством испитиваних компоненти ЕЦМ, што указује на могуће учешће других компонената ЕЦМ ендонеуријума и захтева даља испитивања.
16. Значајно различито присуство анализираних компоненти ЕЦМ указује на другачији патоморфолошки супстрат пери- и ендонеуријумске фиброзе присутне у васкуларној и дијабетесној неуропатији и индиректно указује на учешће различитих патогенетских механизма у настанку истих.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abrahamson DR, St. John PL, Stroganova L, Zelenchuk A, Steenhard BM. (2013) Laminin and type IV collagen isoform substitutions occur in temporally and spatially distinct patterns in developing kidney glomerular basement membranes. *J Histochem Cytochem* 61(10): 706–18.
2. Agliano M, Volpi N, Guarna M, Lorenzoni P, Franci D, Massai L, Grasso G. (2012) Characterization of lymphatic vessels in human peripheral neuropathies, *Ital J Anat Embryol* 117: 12.
3. Aimes RT, Quigley JP. (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 270: 5872–6.
4. Aker FD. (1972) A study of hematic barriers in peripheral nerves of albino rabbits. *Anat Rec* 174: 21–7.
5. Allodi I, Udina E, Navarro X. (2012) Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol* 98: 16–37.
6. Anderson S, Brenner BM. (1986) Effect of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 80: 435–44.
7. Anđelković Z. (2001) Čelije i tkiva. Prvo izdanje. Niš: Bonafides.
8. Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. (1987) 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagen gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 50-flanking region. *Mol Cell Biol* 7: 2256–66.
9. Anik I, Kokturk S, Genc H, Cabuk B, Koc K, Yavuz S, Ceylan Su, Ceylan Sa, Kamaci L, Anik Y. (2011) Immunohistochemical analysis of TIMP-2 and collagen types I and IV in experimental spinal cord ischemia – reperfusion injury in rats. *J Spinal Cord Med* 34(3): 257–64.
10. Arthur MJP. (1990) Matrix degradation in the liver. *Semin Liver Dis* 10: 47–55.
11. Asbury AK. (1973) Renaut bodies. A forgotten endoneurial structure. *J Neuropathol Exp Neurol* 32: 334–43.

12. Aszódi A, Legate KR, Nakchbandi I, Fässler R. (2006) What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:591–621.
13. Atkins S, Smith KG, Loescher AR, Boissonade FM, O'Kane S, Ferguson MW, Robinson PP (2006). Scarring impedes regeneration at sites of peripheral nerve repair. *Neuroreport* 17(12):1245–9.
14. Aumailley M. (2013) The laminin family. *Cell Adh Migr* 7(1):48–55.
15. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24(5):326–32.
16. Azcoitia I, Leonelli E, Magnaghi V, Veiga S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. (2003) Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol Aging* 24(6):853–60.
17. Bahçelioğlu M, Elmas C, Kurkcuoglu A, Calguner E, Erdogan D, Kadioglu D, Gözil R. (2008) Age-related immunohistochemical and ultrastructural changes in rat oculomotor nerve. *Anat Histol Embryol* 37(4):279–84.
18. Bao Y, Yoshida D, Morimoto D, Teramoto A. (2006) Expression of laminin $\beta 2$: A novel marker of hypoxia in pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 17(3): 251–62.
19. Barile C. (1917) Sul reale valore pratico della topografia fascicolare dei nervi periferici (secondo Stoffel) per l'esecuzione dell'anastomosi dei nervi degli arti. *Policlinico* 24: 1177–80.
20. Barkmeier JM, Luschei ES. (2000) Quantitative analysis of the anatomy of the epineurium of the canine recurrent laryngeal nerve. *J Anat* 196:85–101.
21. Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. (2005) Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery* 25(4): 258–67.
22. Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. (2000) Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery* 20: 32–6.
23. Benstead TJ, Dyck PJ, Sangalang V. (1989) Inner perineurial cell vulnerability in ischemia. *Brain Res* 489: 177–81.
24. Bilbao J, Schmidt RE. (2015) Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy. 2nd ed. Springer.
25. Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, McLeod D, Bos KJ. (2003) Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 45: 1041–6.

26. Bizot-Foulon V, Bouchard B, Hornebeck W, Dubertret L, Bertaux B. (1995) Uncoordinate expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 along in vitro proliferative life span of human skin fibroblasts: regulation by all-trans retinoic acid. *Cell Biol Int* 19:129–35.
27. Boor P, Ostendorf T, Floege J. (2010) Renal fibrosis: Novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6: 643–56.
28. Bosboom WMJ, van den Berg LH, Franssen H, Giesbergen PC, Flach HZ, van Putten AM, Veldman H, Wokke JHJ. (2001) Diagnostic value of sural nerve demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 124:2427–38.
29. Bowley MP, Cabral H, Rosene DL, Peters A. (2010) Age changes in myelinated nerve fibers of the cingulate bundle and corpus callosum in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 518:3046–64.
30. Bozkurt A, Deumens R, Beckmannm C, Damink LO, Schügner F, Heschel I, Sellhaus B, Weis J, Jahnne-Dechent W, Brook GA, Pallua N. (2009) In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels. *Biomaterials* 30: 169–79.
31. Bradley JL, King RHM, Muddle JR, Thomas PK. (2000) The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 99: 539–46.
32. Bradley JL, Thomas PK, King RHM, Watkins PJ. (1994) A comparison of perineurial and vascular basal laminal changes in diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol. (Berl)* 88: 426–32.
33. Brinckerhoff CE, Plucinska IM, Sheldon CA, O'Connor GT. (1986) Half-life of synovial cell collagenase mRNA is modulated by phorbol myristate acetate but not by all-trans-retinoic-acid or dexamethasone. *Biochemistry* 25: 6378–84.
34. Bruel A, Oxlund H. (1996) Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation end products of the rat aorta in relation to age. *Atherosclerosis* 127: 155–65.
35. Bunge MB, Wood PM, Tynan LB, Bates ML, Sanes JR. (1989) Perineurium originates from fibroblasts: Demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243: 229–31.
36. Burkel WE. (1966) Perineurium, endoneurium and tissue space in peripheral nerve. *Anat Rec* 154: 325.
37. Burkel WE. (1967) The histological fine structure of perineurium. *Anat Rec* 168: 177–90.

38. Calabresi C, Arosio B, Galimberti L, Scanziani E, Bergottini R, Annoni G, Vergani C. (2007) Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp Gero* 42: 1003–11.
39. Campbell EO, Samlan RA, McMullen NT, Cook S, Smiley-Jewell S, Barkmeier-Kraemer J. (2013) Developmental Changes in the Connective Tissues of the Porcine Recurrent Laryngeal Nerve. *J Anat* 222(6): 625–33.
40. Campero M, Serra J, Ochoa JL. (2005) Peripheral projections of sensory fascicles in the human superficial radial nerve. *Brain* 128(4): 892–5.
41. Candiello J, Cole GJ, Halfter W. (2010) Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol* 29: 402–10.
42. Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. (1999) Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* 195 (Pt 4):563–76.
43. Cepurna WO, Kayton RJ, Johnson EC, Morrison JC. (2005) Age related optic nerve axonal loss in adult Brown Norway rats. *Exp Eye Res* 80:877–84.
44. Chang Y-C, Lin W-M, Hsieh S-T. (2004) Effects of aging on human skin innervation. *NeuroReport* 15:149–53.
45. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC. (1990) Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 39(7): 807–14.
46. Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH. (2000) Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 21: 1541–7.
47. Chen ZL, Strickland S. (2003) Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol* 163: 889–99.
48. Chentanez V, Cha-oumphol P, Kaewsema A, Agthong S, Huanmanop T. (2006) Morphometric Data of Normal Sural Nerve in Thai Adults. *J Med Assoc Thai* 89 (5): 670–4.
49. Chernousov MA, Carey DJ. (2000) Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol* 15(2): 593–601.
50. Chernousov MA, Yu WM, Chen ZL, Carey DJ, Strickland S. (2008) Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia* 56(14):1498–507.

51. Chiono V, Ciardelli G, Vozzi G, Cortez J, Barbani N, Gentile P, Giusti P. (2008) Enzymatically- modified melt-extruded guides for peripheral nerve repair. *Eng Life Sci* 8: 1–12.
52. Chiono V, Tonda-Turo C, Ciardelli G. (2009) Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction. *Int Rev Neurobiol* 87:173–98.
53. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. (2011) Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(5): a004960.
54. Chopra JS, Hurwitz LJ. (1969a) A comparative study of peripheral nerve conduction in diabetes and non-diabetic chronic occlusive peripheral vascular disease. *Brain* 92: 83–96.
55. Chopra JS, Hurwitz LJ. (1969b) Sural nerve myelinated fibre density and size in diabetics. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 32: 149–54.
56. Chu TH, Du Y, Wu W. (2008) Motor nerve graft is better than sensory nerve graft for survival and regeneration of motoneurons after spinal root avulsion in adult rats. *Exp Neurol* 212:562–5.
57. Ciardelli G, Chiono V. (2006) Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci* 6:13–26.
58. Clarke E, Bearn JG. (1972) The spiral bands of Fontana. *Brain* 95: 1–20.
59. Clutterbuck AL, Harris P, Allaway D, Mobasheri A. (2010) Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Vet J* 183: 27–38.
60. Cox RH. (1983) Age-related changes in arterial wall mechanics and composition of NIA Fischer rats. *Mech Ageing Dev* 23: 21–36.
61. Cox RH, Detweiler DK. (1988) Comparison of arterial wall properties in young and old racing greyhounds. *Mech Ageing Dev* 44: 51–67.
62. De Freitas MRG, Nascimento OJM, Chimelli L, et al. (1992) Neuropatia diabética I. Conceito, epidemiologia, classificação, quadro clínico e eletroneuromiográfico. Estudo de 210 casos. *Rev Bras Neurol* 28: 69–73.
63. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, Brook GA. (2010) Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. *Prog Neurobiol* 92: 245–76.
64. Diao E, Vannuyen T. (2000) Techniques for primary nerve repair. *Hand Clin* 16: 53–66.

65. Ding T, Luo ZJ, Zheng Y, Hu XY, Ye ZX. (2010) Rapid repair and regeneration of damaged rabbit sciatic nerves by tissue-engineered scaffold made from nano-silver and collagen type I. *Injury* 41(5):522–7.
66. Dodla MC, Bellamkonda RV. (2006). Anisotropic scaffolds facilitate enhanced neurite extension in vitro. *J Biomed Mater Res A* 78: 213–21.
67. Doinikow B. (1913) Histologische und histopathologische untersuchungen am peripheren nervensystem. Mittels vitales färbung. *Folia Neurobiol* 7: 731–54.
68. Doyu M, Sobue G, Ken E, Kimata K, Shinomura T, Yamada Y, Mitsuma T, Takahashi A. (1993) Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. *J Neurochem* 60:543–51.
69. Duckett S, Scott T. (1913) Glycogen in human fetal sciatic nerve. *Rev Can Biol* 7: 731–7.
70. Du Plessis DG, Mouton YM, Muller CJ, Geiger DH. (1996) An ultrastructural study of the development of the chicken perineurial sheath. *J Anat* 189: 631–41.
71. Dvali L, Mackinnon S. (2003) Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg* 30: 203–21.
72. Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R. (1984) *Peripheral neuropathy*, 2nd edn. London: WB Saunders Company. 39–121.
73. Eames RA, Lange LS. (1967) Clinical and pathological study of ischaemic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 30: 215–26.
74. Ebihara T, Venkatesan N, Tanaka R, Ludwig MS. (2000) Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1569–76.
75. Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR. (1990) Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul* 1:731–40.
76. Esplin DW. (1962) Independences of conduction velocity among myelinated fibers in cat nerve. *J Neurophysiol* 25: 805–21.
77. Esquisatto MAM, de Aro AA, Fêo HB, Gomes L (2014) Changes in the connective tissue sheath of Wistar rat nerve with aging. *Ann Anat* 196: 441–8.
78. Evans GRD, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, Wang B, Meszlenyi RK, Lu L, Mikos AG, Patrick CW Jr. (2002). Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 23: 841–8.

79. Fachinelli A, Masquelet AC, Restrepo J, Gilbert A. (1981) The vascularized sural nerve: Anatomy and surgical approach. *Int J Microsurg* 3: 57–62.
80. Farinon AM, Marbini A, Gemignani F, Govoni E, Bragaglia MM, Sianesi M, et al. (1984) Skeletal muscle and peripheral nerve changes caused by chronic arterial insufficiency — significance and clinical correlations — histological, histochemical and ultrastructural study. *Clin Neuropathol* 3: 240–52.
81. Fernandez HL, Hodges-Savola CA. (1994) Axoplasmic transport of calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve as a function of age. *Neurochem Res* 19: 1369–77.
82. Fernyhough P, Huang JT, Verkhatsky A. (2003) Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy. *J Periph Nerv System* 8: 227–35.
83. Ferreira JM, Caldini EM, Montes GS. (1987) Distribution of elastic fibers in peripheral nerves in mammals. *Acta Anat* 130: 168–73.
84. Ferriere G, Denef JF, Rodriguez J, Guzzetta F. (1985) Morphometric studies of normal sural nerves in children. *Muscle Nerve* 8:697–704.
85. Fleischmajer R, MacDonald ED, Perlsh JS, Burgeson RE, Fisher LW. (1990) Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J Struct Biol* 105(1-3):162–9.
86. Fligiel SEG, Varani J, Datta SH, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2003) Collagen degradation in aged/photoaged skin in vivo and after exposure to MMP-1 in vitro. *J Invest Dermatol* 120: 842–8.
87. Fornaro M, Lee JM, Raimondo S, Nicolino S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. (2008) Neuronal intermediate filament expression in rat dorsal root ganglia sensory neurons: An in vivo and in vitro study. *Neuroscience* 153: 1153–63.
88. Friede RL, Bischhausen R. (1978) The organization of endoneurial collagen in peripheral nerves as revealed with the scanning electron microscope. *J Neurol Sci* 38:83–8.
89. Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. (2002) Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis, in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 123: 413–25.
90. Gambe HJ. (1964) Comparative electron microscopic observations on the connective tissues of a peripheral nerve and a spinal nerve root in the rat. *J Anat* 98: 17–24.
91. Gambe HJ, Breathnach AS. (1965) An electron microscope study of human foetal peripheral nerves. *J Anat* 99: 573–84.

92. Gambe HJ, Eames RA. (1964) An electron microscope study of the connective tissues of human peripheral nerve. *J Anat* 98: 655–63.
93. Gavazzi I, Boyle KS, Cowen T. (1996) Extracellular matrix molecules influence innervation density in rat cerebral blood vessels. *Brain Res* 734: 167–74.
94. Gavazzi I, Boyle KS, Edgar D, Cowen T. (1995) Reduced laminin immunoreactivity in the blood vessel wall of ageing rats correlates with reduced innervation in vivo and following transplantation. *Cell Tissue Res* 281: 23–32.
95. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. (2003) Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55(12):1531–46.
96. Geuna S, Nicolino S, Raimondo S, Gambarotta G, Battiston B, Tos P, Perroteau I. (2007) Nerve regeneration along bioengineered scaffolds. *Microsurgery* 27: 429–38.
97. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Czaja K, Fornaro M. (2009) Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* 87: 27–46.
98. Ghalib N, Houšťava L, Haninec P, Dubový P. (2001) Morphometric analysis of early regeneration of motor axons through motor and cutaneous nerve grafts. *Ann Anat* 183: 363–8.
99. Giannini C, Dyck PJ. (1995) Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol* 37(4): 498–504.
100. Goh SY, Cooper ME. (2008) The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1143–52.
101. Gregg EW, Gu Q, Williams D, et al. (2007) Prevalence of lower extremity diseases associated with normal glucose levels, impaired fasting glucose, and diabetes among U.S. adults aged 40 or older. *Diabetes Res Clin Pract* 77:485–8.
102. Griffin JW, Hoffman PN. (1993) Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: Dyck PJ, Thomas P, editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders.
103. Grimpe B, Dong S, Doller C, Temple K, Malouf AT, Silver J. (2002) The critical role of basement membrane-independent laminin gamma 1 chain during axon regeneration in the CNS. *J Neurosci* 22(8):3144–60.
104. Guo XD, Johnson JJ, Kramer JM. (1991) Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature* 349: 707–9.

105. Guo XD, Kramer JM. (1989) The two *Caenorhabditis elegans* basement membrane (type IV) collagen genes are located on separate chromosomes. *J Biol Chem* 264: 17574–82.
106. Haftek J. (1970) Stretch injury of peripheral nerve. Acute effects of stretching on rabbit nerve. *J Bone Joint Surg Br* 52:354–65.
107. Hall S. (1997) Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 190: 57–71.
108. Hansen JT, Lambert DR. (2005) *Netter's Clinical Anatomy*. Philadelphia: Saunders.
109. Hemat RAS. (2008) *Principles of orthomolecularism*. Urotext.
110. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cell II. Expression of collagenases and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 261: 2814–8.
111. Hill R. (2009) Extracellular matrix remodelling in human diabetic neuropathy. *J Anat* 214:219–25.
112. Hill RE, Williams PE. (2002) A quantitative analysis of perineurial cell basement membrane collagen IV, laminin and fibronectin in diabetic and non-diabetic human sural nerve, *J Anat* 201(2):185–92.
113. Hill RE, Williams PE. (2004) Perineurial cell basement membrane thickening and myelinated nerve fibre loss in diabetic and nondiabetic peripheral nerve. *J Neurol Sci* 217:157–63.
114. Hohenester E, Yurchenco PD. (2013) Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr* 7(1): 56–63.
115. Honma Y, Araki T, Gianino S, Bruce A, Heuckeroth R, Johnson E, Milbrandt J. (2002) Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 35(2): 267–82.
116. Hope J, Bourne GH. (1963) Electron microscopic demonstration of the perineurial epithelium in rat peripheral nerve. *Acta Anat* 52: 193–201.
117. Hromada J. (1963) On the nerve supply of the connective tissues of some peripheral nervous system component. *Acta Anatomica* 55: 343–51.
118. Huang CC, Hall DH, Hedgecock EM, Kao G, Karantza V, Vogel BE, et al. (2003) Laminin alpha subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130:3343–58.

119. Hubert T, Grimal S, Carroll P, Fichard-Carroll A. (2009) Collagens in the developing and diseased nervous system. *Cell Mol Life Sci* 66: 1223–38.
120. Hubert T, Grimal S, Ratzinger S, Mechaly I, Grassel S, Fichard-Carroll A. (2007) Collagen XVI is a neural component of the developing and regenerating dorsal root ganglia extracellular matrix. *Matrix Biol* 26: 206–10.
121. Huelke DF. (1957) A study of the formation of the sural nerve in adult man. *Am J Phys Anthropol* 15: 137–45.
122. Hur MS, Kim HC, Won SY, Hu KS, Song WC, Koh KS, Kim HJ. (2013) Topography and spatial fascicular arrangement of the human inferior alveolar nerve. *Clin Implant Dent Relat Res* 15(1): 88-95.
123. Hutchinson EC, Liversedge LA. (1956) Neuropathy in peripheral vascular disease: its bearing on diabetic neuropathy. *Quart J Med* 25:267–74.
124. Ilic A, Blagotic M, Malobabic S, Radonjic V. (1957) Some morphological characteristics of the sural nerve. *Istria Med* 17: 31–4.
125. Ishiyama A, Mowry SE, Lopez IA, Ishiyama G. (2009) Immunohistochemical distribution of basement membrane proteins in the human inner ear from older subjects. *Hear Res* 254 (1-2):1–14.
126. Itoh S, Shinomiya K, Samejima H, Ohta T, Ishizuki M, Ichinose S. (1996) Experimental study on nerve regeneration through the basement membrane tubes of the nerve, muscle, and artery. *Microsurgery* 17: 525–34.
127. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. (1999) Effect of Pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in Bleomycin hamster model of lung. *JPET* 289: 211–8.
128. Jacobs JM, Love S. (1985) Qualitative and quantitative morphology of the human sural nerve at different ages. *Brain* 108: 897–924.
129. Jeronimo A, Jeronimo CA, Rodrigues Filho OA, Sanada LS, Fazan VP. (2008) A morphometric study on the longitudinal and lateral symmetry of the sural nerve in mature and aging female rats. *Brain Res* 1222:51–60.
130. Jessen KR, Mirsky R. (1999) Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22: 402–10.
131. Johnson BM, Miao M, Sadun AA. (1987) Age-related decline of human optic nerve axon population. *Age* 10:5–9.
132. Johnson PC, Doll SC, Crome DW. (1986) Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 19: 450–7.

133. Joosten EA, Dijkstra S, Brook GA, Veldman H, Bär PR. (2000) Collagen IV deposits do not prevent regrowing axons from penetrating the lesion site in spinal cord injury. *J Neurosci Res* 62(5):686–91.
134. Junqueira CL, Carneiro J, Kelley OR. (1995) Basic histology. Stamford: Appleton and Lange.
135. Junqueira LCU, Montes GS, Kristzan RM. (1979) The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell Tissue Res* 202; 453–60.
136. Kališnik M. (1985) Temelji stereologije. *Acta Stereologica* 4(1): 1–148.
137. Kalluri R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3(6): 422–33.
138. Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler MM. (2001) Nerve regeneration through an epineurial sheath: Its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery* 21: 196–201.
139. Kauppila T, Jyväsjärvi E, Huopaniemi T, Hujanen E, Liesi P. (1993) A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 123(2):181–91.
140. Kawamura Y, Okazaki H, O'Brien PC, Dyck PJ. (1977) Lumbar motoneurons of man: I. Number and diameter histogram of alpha and gamma axons of ventral root. *J Neuropathol Exp Neurol* 36:853–60.
141. Kemp SW, Walsh SK, Midha R. (2008) Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair. *Neurol Res* 30: 1030–8.
142. Kerjaschi D, Stockinger L. (1970) Zur Struktur und funktion des perineuriums. Die endigungsweise des perineuriums vegetativer nerven. *Z Zellforsch* 110: 386–400.
143. Kida Y, Duffield JS. (2011) Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 417–23.
144. Kijeńska E, Prabhakaran MP, Swieszkowski W, Kurzydowski KJ, Ramakrishna S. (2012) Electrospun bio-composite P(LLA-CL)/collagen I/collagen III scaffolds for nerve tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100(4):1093–102.
145. Klemm H. (1970) Das perineurium als diffusions barriere gegenüber peroxydase beu epi und endoneuraler applikation. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 108: 431–45.
146. Koopmans G, Hasse B, Sinis N. (2009) Chapter 19: The role of collagen in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol* 87:363–79.
147. Kovačić U, Sketelj J, Bajrović FF. (2009) Age-related differences in the reinnervation after peripheral nerve injury. *Int Rev Neurobiol* 87: 465–82.

148. Kristensson K. (1965) Transport of fluorescent protein tracer in peripheral nerves. *J Anat* 99: 573–84.
149. Kristensson K, Olsson Y. (1971) The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers. Differences between mature and immature animals. *Acta Neuropath* 17: 127–38.
150. Kuecherer-Ehret A, Graeber MB, Edgar D, Thoenen H, Kreutzberg GW. (1990) Immunoelectron microscopic localization of laminin in normal and regenerating mouse sciatic nerve. *J Neurocytol* 19(1):101–9.
151. Kundalić B, Ugrenović S, Jovanović I, Stefanović N, Petrović V, Kundalić J, Pavlović M, Antić V. (2014a) Analysis of fascicular structure and connective tissue sheaths in sural nerve during aging. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 31(2): 113–20.
152. Kundalić B, Ugrenović S, Jovanović I, Stefanović N, Petrović V, Kundalić J, Stojanović V, Živković V, Antić V. (2014b) Morphometric analysis of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients. *Biomed Res Int* 2014:870930.
153. Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H, Ginty DD. (2004) A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118(2): 243–55.
154. Kühn K. (1995) Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol* 14: 439–45.
155. La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. (1996) Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Exp Med* 184: 2311–26.
156. Labrador RO, Butí M, Navarro X. (1998) Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 149(1):243–52.
157. Latker CH, Lynch KJ, Shinowara NL, Rapoport SI. (1985) Vesicular profiles in frog perineurial cells preserved by rapid freezing and freeze substitution. *Brain Res* 345: 170–5.
158. Li J, Shi R. (2007) Fabrication of patterned multi-walled poly-L-lactic acid conduits for nerveregeneration. *J Neurosci Methods* 165: 257–64.

159. Li S, Edgar D, Fässler R, Wadsworth W, Yurchenco PD. (2003) The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* 4: 613–24.
160. Li S, Liquari P, McKee KK, Harrison D, Patel R, Lee S, Yurchenco PD. (2005) Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol* 169: 179–89.
161. Lieberman AR. (1968) The connective tissue elements of the mammalian nodose ganglion. An electron microscope study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 89: 95–111.
162. Lieberman AR. (1971) The axon reaction: A review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol.* 14: 49–124.
163. Liu CT, Benda CE, Lewey FH. (1948) Tensile strength of human nerves. *Arch Neurol and Psychiat* 59:322–36.
164. Liu HM. (1996) Growth factors and extracellular matrix in peripheral nerve regeneration, studied with a nerve chamber. *J Peripher Nerv Syst* 1: 97–110.
165. Llewelyn JG, Thomas PK. (1987) Perineurial sodium-potassium ATPase activity in streptozotocin-diabetic rats. *Exp Neurol* 97: 375–82.
166. Lorimier P, Mezin P, Labat Moleur F, et al. (1992) Ultrastructural localization of the major components of the extracellular matrix in normal rat nerve. *J Histochem Cytochem* 40:859–68.
167. Low PA, Lagelund TD, Mc Manis PG. (1989) Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic and ischemic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 31: 355–438.
168. Low PA, Schmelzer JD, Ward KK, Yao JK. (1986) Experimental chronic hypoxic neuropathy: relevance to diabetic neuropathy. *Am J Physiol* 250(1 Pt 1):E94–9.
169. Lowry A, Wilcox D, Masson EA, Williams PE. (1997) Immunohistochemical methods for semiquantitative analysis of collagen content in human peripheral nerve. *J Anat* 91:367–74.
170. Lubińska L. (1982) Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. *Brain Res* 233: 227–40.
171. Luckenbill-Edds L. (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev* 23(1-2):1–27.
172. Lundborg G. (1975) Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation and nerve function. *J Bone Joint Surg Am* 57: 938–48.

173. Malik RA, Veves A, Masson EA, Sharma AK, Ah-See AK, Schady W, Lye RH, Boulton AJ. (1992) Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55(7): 557–61.
174. Marieb EN. (2003) *Human Anatomy and Physiology*. 6th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.
175. Marner L, Nyengaard JR, Tang Y, Pakkenberg B. (2003) Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J Comp Neurol* 462:144–152.
176. Martinelli C, Sartori P, Ledda M, Pannese E. (2003). Age-related quantitative changes in mitochondria of satellite cell sheaths enveloping spinal ganglion neurons in the rabbit. *Brain Res Bull* 61: 147–51.
177. Martin GR, Timpl R. (1987) Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol* 3: 57–85.
178. McKee KK, Harrison D, Capizzi S, Yurchenco PD. (2007) Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem* 282:21437–47.
179. McKenzie D, Nukada H, van Rij AM, McMorran PD. (1999) Endoneurial microvascular abnormalities of sural nerve in non-diabetic chronic atherosclerotic occlusive disease. *J Neurol Sci* 162(1):84–8.
180. McQuarrie IG, Brady ST, Lasek RJ (1989). Retardation in the slow axonal transport of cytoskeletal elements during maturation and aging. *Neurobiol Aging* 10: 359–65.
181. Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L. (2000) Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol* 60(3):291–308.
182. Mendell JR, Kissel JT, Cornblath DR. (2001) *Diagnosis and management of peripheral nerve disorders*. New York: Oxford University Press.
183. Menter DG, DuBois RN. (2012) Prostaglandins in cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Int J Cell Biol* 2012: 723419.
184. Mestdagh H, Drizenko A, Maynou C, Demondion X, Monier R. (2001) Origin and make up of the human sural nerve. *Surg Radiol Anat* 23(5): 307–12.
185. Midroni G, Bilbao JM. (1985) *Biopsy Diagnosis of Peripheral Neuropathy*. Boston: Butterworth-Heinemann.
186. Millaruelo AI, Nieto-Sampedro M, Cotman CW. (1988) Cooperation between nerve growth factor and laminin or fibronectin in promoting sensory neuron survival and neurite outgrowth. *Brain Res* 466: 219–28.
187. Millesi H. (1990) Progress in peripheral nerve reconstruction. *World J Surg* 14: 733–47.

188. Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE. (2004) Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131:2247–56.
189. Miner JH, Sanes JR. (1994) Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol* 127(3):879–91.
190. Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D. (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol (Paris)* 96: 17–24.
191. Moradzadeh A, Borschel GH, LucianoJP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, Mackinnon SE. (2008) The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol* 212: 370–6.
192. Mufson I. (1952) Diagnosis and treatment of neural complications of peripheral arterial obliterative disease. *Angiology* 3: 392–6.
193. Mukouyama YS, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ. (2002) Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109 (6): 693–705.
194. Mulder JD. (1938) An experimental and critical study on the spreading of foreign substances in the nerve. *Acta Morph Neerl Scand* 1: 238–304.
195. Muller HW, Stoll G. (1998) Nerve injury and regeneration: Basic insights and therapeutic interventions. *Curr Opin Neurol* 11: 557–62.
196. Muona P, Peltonen J. (1994) Connective tissue metabolism in diabetic peripheral nerves. *Ann Med* 26: 39–43.
197. Muona P, Peltonen J, Jaakkola S, Uitto J. (1991) Increased matrix gene expression by glucose in rat neural connective tissue cells in culture. *Diabetes* 40: 605–11.
198. Mustafa GY, Gamble HJ. (1978) Observations on the development of the connective tissues of developing human nerve. *J Anat* 127(Pt 1):141–55.
199. Niyibizi C, Eyre DR. (1989) Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res* 20(1-4):247–50.
200. Nukada H, van Rij AM, Packer SGK, McMorran PD. (1996) Pathology of acute and chronic ischaemic neuropathy in atherosclerotic peripheral vascular disease. *Brain* 119: 1449–60.
201. O'Sullivan DJ, Swallow M. (1968) The fibre size and content of the radial and sural nerves. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31(5):464–70.

202. Ochoa J. (1971) The sural nerve of the human fetus electron microscope observations and counts of axon. *J Anat* 108: 231–45.
203. Ohara S, Ikuta F. (1985) On the occurrence of fenestrated vessels in Wallerian degeneration of the peripheral nerve. *Acta Neuropath* 68: 259–62.
204. Oldfors A. (1980) Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropath* 49: 43–9.
205. Olsson Y. (1968) Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system. *Acta Neuropath* 10: 26–33.
206. Olsson Y. (1971) Mast cells in human peripheral nerve. *Acta Neural Scand* 47: 357–68.
207. Olsson Y. (1990) Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol* 5: 265–311.
208. Olsson Y, Kristensson K. (1973) The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. *Acta Neuropath* 23:105–11.
209. Olsson Y, Kristensson K, Klatzo I. (1971) Permeability of blood vessels and connective tissue sheaths in the peripheral nervous system to exogenous proteins. *Acta Neuropath* 17 (Supl 5): 61–9.
210. Olsson Y, Resse TS. (1971) Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 30: 105–19.
211. Ortigüela ME, Wood MB, Cahill DR (1987). Anatomy of the sural nerve complex. *J Hand Surg Am* 12(6): 1119–23.
212. Osawa T, Ide C. (1986) Changes in thickness of collagen fibrils in the endo- and epineurium of mouse sciatic during development. *Acta Anat* 125: 245–51.
213. Ouvrier RA, McLeod JG, Conehin T. (1987) Morphometric studies of sural nerve in childhood. *Muscle Nerve* 10:47–53.
214. O'Daly JA, Imaneda T. (1967) Electron microscopy study of Wallerian degeneration in cutaneous nerves caused by mechanical injury. *Lab Invest* 17: 744–71.
215. Paetau A, Mellström K, Vaheri A, Haltia M. (1980) Distribution of a major connective tissue protein fibronectin, in normal and neoplastic human nerve tissue. *Acta Neuropathol* 51: 47–51.
216. Pannese E. (2011) Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Struct Funct* 216(2):85–9.

217. Paraskevas GK, Natsis K, Tzika M, Ioannidis O. (2014) Fascial entrapment of the sural nerve and its clinical relevance. *Anat Cell Biol* 47(2): 144–7.
218. Parks WC, Shapiro DS. (2001) Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2: 10–9.
219. Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR, Mirsky R. (1999) Schwann cell-derived desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23: 713–24.
220. Patel M, Mao L, Wu B, Vandevord PJ. (2007) GDNF-chitosan blended nerve guides: A functional study. *J Tissue Eng Regen Med* 1: 360–7.
221. Patton BL. (2000) Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech* 51(3): 247–61.
222. Patton BL, Cunningham JM, Thyboll J, Kortessmaa J, Westerblad H, Edström L, Tryggvason K, Sanes JR. (2001) Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nat Neurosci* 4:597–604.
223. Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. (1997) Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol* 139:1507–21.
224. Peer S, Gruber H. (2013) Atlas of peripheral nerve ultrasound. Heidelberg: Springer.
225. Penkert G, Fansa H. (2004) Peripheral nerve lesions. Berlin: Springer.
226. Pertici V, Laurin J, Féron F, Marqueste T, Decherchi P. (2014) Functional recovery after repair of peroneal nerve gap using different collagen conduits. *Acta Neurochir (Wien)* 156(5):1029–40.
227. Peters A. (2002) The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: A review. *J Neurocytol* 31: 581–93.
228. Peters A, Sethares C, Moss MB. (2010) How the primate fornix is affected by age. *J Comp Neurol* 518:3962–80.
229. Piez KA. (1984) Molecular and aggregate structure of the collagens. In: Piez KA, Reddi H, editors. *Extracellular Matrix Biology*. Amsterdam: Elsevier; 1–39.
230. Pleasure D. (1984) The structural proteins of peripheral nerve. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP, editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia/London/Toronto: Saunders; 1: 441–52.
231. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131:1619–28.

232. Purves D, Nja A. (1978) Trophic maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. In: Cotman CW, editor. *Neuronal Plasticity*. New York: Raven Press.
233. Putti V. (1916) Sulla topografia fascicolare dei nervi periferici e piu specialmente dello sciatic popliteo externo. *Clinica Chir* 24: 1021–35.
234. Rechthand E, Hernoven A, Sato S, Rapoport SI. (1986) Distribution of adrenergic innervation of blood vessels in peripheral nerve. *Brain Res* 374: 185–9.
235. Reiber G, Boyko E, Smith DG. (1995) Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In: Harris MI, Cowie CC, Stern MP, Boyko EJ, Reiber GE, Bennett PH, editors. *Diabetes in America*. 2nd ed. Washington: Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
236. Reina MA, Arriazu R, Collier CB, Sala-Blanch X, Izquierdo L, de Andrés J. (2013) Electron microscopy of human peripheral nerves of clinical relevance to the practice of nerve blocks. A structural and ultrastructural review based on original experimental and laboratory data. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 60(10): 552–62.
237. Reina MA, López A, Villanueva MC, De Andrés JA, León GI. (2000) Morfología de los nervios periféricos, de sus cubiertas y de su vascularización. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 47: 464–75.
238. Reina MA, López A, Villanueva MC, De Andrés JA, Machés F. (2003) The blood-nerve barrier in peripheral nerves. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 50(2): 80–6.
239. Resnick HE, Vinik AI, Schwartz AV, et al. (2000) Independent effects of peripheral nerve dysfunction on lower-extremity physical function in old age: the Women's Health and Aging Study. *Diabetes Care* 23:1642–7.
240. Ricciarelli R, Mini P, Ozer N, Zingg JM, Azzi A. (1999) Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase c inhibition. *Free Radic Biol Med* 27: 729–37.
241. Richardson LL, Kleinman HK, Dym M (1995) The effect of aging on basement membrane in the testis. *J Andol* 16: 118–26.
242. Ross MH, Pawlina W. (2011) *Histology: A text and atlas*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
243. Said G. (2007) Diabetic neuropathy – a review. *Nature Clinical Practice Neurology* 3: 331–40.
244. Saito A, Zacks SI. (1969) Ultrastructure of Schwann and perineural sheath at the mouse neuromuscular junction. *Anat Rec* 164: 379–82.

245. Salonen V. (1987) Connective tissue reactions to peripheral nerve injury. *Ann Univ Turku* 28: 1–8.
246. Salonen V, Lehto M, Vaheri A, Aro H, Peltonen J. (1985) Endoneurial fibrosis following nerve transection. An immunohistological study of collagen types and fibronectin in the rat. *Acta Neuropathol* 67: 315–21.
247. Salonen V, Peltonen J, Røyttä M, Virtanen I. (1987) Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration *J Neurocytol* 16(5):713–20.
248. Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. (1990) Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol* 111:1685–99.
249. Sartori S, Rechichi A, Ciardelli G, Caporale A, Vozzi G, Mazzucco L. (2007) New strategies in polymeric biomaterials functionalisation. *Eur Cells Mater* 14(18): 8.
250. Sartori S, Rechichi A, Vozzi G, D'Acunto M, Heine E, Giusti P, Ciardelli G. (2008) Surface modification of a synthetic polyurethane by plasma glow discharge: Preparation and characterization of bioactive monolayers. *React Funct Polym* 68: 809–21.
251. Schellens RLLA, van Veen BK, Gabreels-Festen AAWN, et al. (1993) A statistical approach to fiber diameter distribution in human sural nerve. *Muscle Nerve* 16:1342–1350.
252. Schiff R, Rosebluth J. (1986) Ultrastructural localization of laminin in rat sensory ganglia. *J Histochem Cytochem* 34: 1691–5.
253. Schmidt KG, Bergert H, Funk RHW. (2008) Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery. *Curr Neuropharmacol* 6: 164–178.
254. Schroder JM, Bohl J, Brodda K. (1978) Changes of the ratio between myelin thickness and axon diameter in the human developing sural nerve. *Acta Neuropathol* 43:169–78.
255. Schubert T, Friede RL. (1981) The role of the endoneurial fibroblasts in myelin degradation. *J Neuropathol Exp Neurol* 40: 134–54.
256. Schwarzbauer JE, DeSimone DW. (2011) Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7): a005041.
257. Seneviratne KN, Peiris OA. (1970) The role of diffusion barriers in determining the excitability of peripheral nerve. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 33: 310–8.

258. Seppanen A, Autio-Harmainen H, Alafuzoff L, Sarkioja T, Veijola J, Hurskainen T, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K, Majamaa K. (2006) Collagen XVII is expressed in human CNS neurons. *Matrix Biol* 25: 185–8.
259. Serot JM, Foliguet B, Bebe MC, Faure GC. (2001) Choroid plexus and aging in rats: a morphometric and ultrastructural study. *Eur J Neurosci* 14: 794–8.
260. Shankar N, Selvam RP, Dhanpal N, Reddy R, Alapati A. (2010) Anatomical variations of the sural nerve in the leg: a fetal study. *Neurol India* 58(1): 24–8.
261. Shanta TR, Bourne GH. (1968) The perineural epithelium. A new concept. In: Bourne GH, editor. *Structure and function of nervous tissue* (vol. 1). New York: Academic Press. 379–459.
262. Shantaveerappa T, Bourne GH. (1964) Enzyme histochemical properties of the perineurial epithelium following nerve transection. *Anat Rec* 150: 35–47.
263. Shantaveerappa T, Bourne GH. (1966) Perineural epithelium. A new concept of its role in the integrity of the peripheral nervous system. *Science* 154: 1464–7.
264. Shanthaveerappa TR, Bourne GH. (1962) The perineural epithelium, a metabolically active continuous protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. *J Anat* 96: 527–37.
265. Shanthaveerappa TR, Bourne GH. (1963) The perineural epithelium: nature and significance. *Nature* 199: 577–9.
266. Sharghi-Namini S, Turmaine M, Meier C, Sahni V, Umehara F, Jessen KR, Mirsky R. (2006). The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J Neurosci* 26, 6364–76.
267. Shield LK, King HM, Thomas PK. (1986) A morphologic study of human fetal sural nerve. *Acta Neuropath* 70: 60–70.
268. Shinowara NL, Michel ME, Rapoport SI. (1981) Morphological correlates of permeability in the frog perineurium: vesicles and transcellular channels. *Cell Tissue Res* 227: 11–22.
269. Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. (2009) *Int Rev Neurobiol* 87:141–72.
270. Silvestri E, Martinoli C, Derchi LE, Bertolotto M, Chiaramondia M, Rosenberg I. (1995) Echotexture of peripheral nerves: correlation between US and histologic findings and criteria to differentiate tendons. *Radiology* 197(1): 291–6.
271. Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. (2003) Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52:2867–73.

272. Smith AG, Rose K, Singleton JR. (2008) Idiopathic neuropathy patients are at high risk for metabolic syndrome. *J Neurol Sci* 273:25–8.
273. Smith AG, Singleton JR. (2006) Idiopathic neuropathy, prediabetes and the metabolic syndrome. *J Neurol Sci* 242:9–14.
274. Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, et al. (1999) Absence of basement membranes after targeting the *lamc1* gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 144:151–60.
275. Soderfeldt B, Olsson Y, Kistensson K. (1973) The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers in human peripheral nerve. *Acta Neuropath* 25: 120–6.
276. Solomon LB, Ferris L, Tedman R, Henneberg M. (2001) Surgical anatomy of the sural and superficial fibular nerves with an emphasis on the approach to the lateral malleolus. *J Anat* 199(6): 717–23.
277. Steer JC, Horney FD. (1968) Evidence for passage of cerebrospinal fluid along spinal nerves. *Can Med Ass J* 98: 71–4.
278. Stefanović BD, Đorđević-Čamba V, Kojić Z, Bajčetić M, Četković M. (2003) Integrativna neurobiologija: ćelijska i tkivna neurologija. Beograd: Mikro knjiga i B&M.
279. Stevens A, Jacobs JR. (2002) Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *J Neurosci* 22: 4448–55.
280. Steward W. (1999) Marimastat (BB2516) current status of development. *Cancer Chem Pharmacol* 43 (Suppl.): S56–S60.
281. Stewart JD. (2003) Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve* 28: 525–41.
282. Stichel CC, Hermanns S, Luhmann HJ, Lausberg F, Niermann H, D'Urso D, Servos G, Hartwig HG, Müller HW. (1999) Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur J Neurosci* 11(2): 632–46.
283. Stoffel A. (1915) Ueber die Behandlung verletzter Nerven im Kriege. *München Med Wehnschr* 62: 201–3.
284. Stoll G, Muller HW. (1999) Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: Basic insights. *Brain Pathol* 9: 313–25.
285. Sunderland S. (1945a) Traumatic injuries of peripheral nerves: simple compression injuries of the radial nerve. *Brain* 68:56–72.
286. Sunderland S. (1945b). The intraneural topography of the radial, median, and ulnar nerves. *Brain* 68: 243.

287. Sunderland S. (1945c) The adipose tissue of peripheral nerves. *Brain* 68:118–22.
288. Sunderland S. (1946) The effect of rupture of the perineurium on the contained nerve fibres. *Brain* 69: 149–52.
289. Sunderland S. (1965) The connective tissues of peripheral nerves. *Brain* 88: 841–54.
290. Sunderland SS. (1978) *Nerves and Nerve Injuries*, 2nd Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
291. Sunderland S, Bradley KC. (1949) The cross-sectional area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibres. *Brain* 72: 428–49.
292. Sunderland S, Bradley KC. (1950) Endoneurial tube shrinkage in the distal segment of a severed nerve. *J Comp Neurol* 93: 411–24.
293. Sunderland S, Bradley KC. (1952) The perineurium of peripheral nerves. *Anat Rec* 113: 125–41.
294. Sund M, Vaisanen T, Kaukinen S, Ilves M, Tu H, Autio-Harmainen H, Rauvala H, Pihlajaniemi T. (2001) Distinct expression of type XIII collagen in neuronal structures and other tissues during mouse development. *Matrix Biol* 20: 215–31.
295. Tang J, Wang XM, Hu J, Luo E, Qi MC. (2008) Autogenous standard versus inside-out vein graft to repair facial nerve in rabbits. *Chin J Traumatol* 11: 104–9.
296. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. (2013) Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmology* 2013: 343560.
297. Teunissen LL, Notermans NC, Jansen GH, Banga JD, Veldman H, Wokke JHJ. (2000) Thickness of endoneurial vessel basal lamina area in chronic idiopathic axonal polyneuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:445–50.
298. Tierney GM, Griffin NR, Stuart RC, Kasem H, Lynch JT, Brown PD, Millar AW, Steele RJ, Parsons SL. (1999) A pilot study of the safety and effects of the matrix metalloproteinases inhibitor marimastat in gastric cancer. *Eur J Cancer* 35: 563–8.
299. Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R, Lindholm D, Meyer M, Rohrer H. (1988) Nerve growth factor: Cellular localization and regulation of synthesis. *Cell Mol Neurobiol* 8: 35–40.
300. Thomas PK. (1963) The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. *J Anat* 97: 34–44.
301. Thomas PK, Jones DG. (1967) The cellular response to nerve injury. Regeneration of the perineurium after nerve section. *J Anat* 101: 45–55.
302. Thomas PK, Olsson Y. (1984) Microscopic anatomy and function of the connective tissue components of peripheral nerve. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH,

- Bunge RP, editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia/London/Toronto: Saunders; 1: 97–120.
303. Thomopoulos GN, Spicer SS, Gratton MA, Schulte BA. (1997) Age-related thickening of basement membrane in stria vascularis capillaries. *Hear Res* 111: 31–41.
304. Timpl R, Brown JC. (1994) The laminins. *Matrix Biol* 14(4):275–81.
305. Tohgi H, Tsukagoshi H, Toyokura Y. (1977) Quantitative changes with age in normal sural nerves. *Acta Neuropath* 38: 213–20.
306. Tonge DA, Golding JP, Edbladh M, Kroon M, Ekström PE, Edström A. (1997) Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. *Exp Neurol* 146(1):81–90.
307. Topp KS, Boyd BS. (2006) Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys Ther* 86: 92–109.
308. Torres VE, Leof EB. (2011) Fibrosis, Regeneration, and Aging: Playing Chess with Evolution. *JASN* 22(8):1393–6.
309. Trullson M. (2001) Mechanoreceptive afferents in the human sural nerve. *Exp Brain Res* 137:111–6.
310. Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM. (2006) Laminin and growth factor receptor activation stimulates differential growth responses in subpopulations of adult DRG neurons. *Eur J Neurosci* 24: 676–90.
311. Ubogu EE. (2013) The molecular and biophysical characterization of the human blood-nerve barrier: Current concepts. *J Vasc Res* 50(4): 289–303.
312. Ugrenovic SZ, Jovanovic ID, Stefanovic BD. (2008) Microanatomical structure of the human sciatic nerve. *Surg Radiol Anat* 30:619–26.
313. Ugrenović S. (2006) *Anatomske, histohemijske i morfometrijske karakteristike humanog išijadičnog nerva*. Niš: doktorska disertacija.
314. Ugrenović S, Jovanović I, Vasović L. (2011) Morphometric analysis of human sciatic nerve perineurial collagen type IV content. *Microsc Res Tech* 74(12): 1127–33.
315. Ugrenović S, Vasović Lj, Jovanović I, Stefanovic N. (2005) Peculiarities of the sural nerve complex morphologic types in human fetuses. *Surg Radiol Anat* 27(1): 25–9.
316. Uluutku H, Can MA, Kurtoglu Z. (2000) Formation and location of the sural nerve in the newborn. *Surg Radiol Anat* 22: 97–100.

317. Usbiki T, Ide C. (1986) Three-dimensional architecture of the endoneurium with special reference to the collagen fibril arrangement in relation to nerve fibers. *Arch Histol Jap* 49: 553–63.
318. Uspenskaia O, Liebetrau M, Herms J, Danek A, Hamann G. (2004) Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC Neurosci* 124:5–37.
319. van Schie CH. (2008) Neuropathy: mobility and quality of life. *Diabetes Metab Res Rev* 24(Suppl. 1):S45–S51.
320. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SEG, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2006) Decreased collagen production in chronologically aged skin. *Am J Pathol* 168(6): 1861–8.
321. Varani J, Perone P, Fligiel SEG, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2002) Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J Invest Dermatol* 119: 122–9.
322. Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, Wang ZQ, Datta SC, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2000) Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol* 114: 480–6.
323. Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. (2000) Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 5(4): 191–208.
324. Vinik AI, Strotmeyer ES, Nakave AA, Patel CV. (2008) Diabetic neuropathy in older adults. *Clin Geriatr Med* 24(3): 407–35.
325. Vital A, Vital C, Brechenmacher C, Serise JM, Callen S, Nicolau H, Videau J. (1986) Quantitative, histological and ultrastructural studies of peripheral nerve in arteriosclerotic non-diabetic patients. *Clin Neuropathol* 5(5):224–9.
326. Vivo J, Morales JL, Diz A et al. (2004) Intracranial portion of the trochlear nerve and dorsal oblique muscle composition in dog: astructural and ultrastructural study. *J Morphol* 262: 708–13.
327. Vogelesang MG, Scherer SS, Fawcett JW, French-Constant C. (1999) Regulation of fibronectin alternative splicing during peripheral nerve repair. *J Neurosci Res* 15;56(4):323–33.

328. Vojtková J, Čiljaková M, Bánovčin P. (2012) Diabetic Microangiopathy – Etiopathogenesis, New Possibilities in Diagnostics and Management. In: De Cristofaro R, editor. Microangiopathy. Rijeka: InTech. 37–66.
329. Wada R, Yagihashi S. (2005) Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1043: 598–604.
330. Waggener JD, Beggs J. (1967) The membranous covering of neural tissues: an electron microscopy study. *J Neuropath Exp Neurol* 26: 412–26.
331. Waggener JD, Bunn SM, Beggs J. (1965) The diffusion of ferritin within the peripheral nerve sheath: an electron microscopy study. *J Neuropath Exp Neurol* 24: 430–43.
332. Waksman BH. (1961) Experimental study of diphtheritic polyneuritis in the rabbit and guinea pig. III The blood-nerve barrier in the rabbit. *J Neuropathol Exp Neurol* 20: 35–77.
333. Wang GY, Hirai K, Shimada H, Taji S, Zhong SZ. (1992) Behavior of axons, Schwann cells and perineurial cells in nerve regeneration within transplanted nerve grafts: effects of anti-laminin and anti-fibronectin antisera. *Brain Res* 583: 216–26.
334. Webb J, Moorjani N, Radford M. (2000) Anatomy of the sural nerve and its relation to the Achilles tendon. *Foot Ankle Int* 21(6): 475–7.
335. Weller RO, Cervós-Navarro J. (1977) Pathology of peripheral nerves. London: Butterworths & Co.
336. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, Moore AM, Tong AY, Mackinnon SE, Borschel GH (2009). Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve* 39(6):787–99.
337. Willem M, Miosge N, Halfter W, Smyth N, Jannetti I, Burghart E, et al. Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development. *Development*. 2002;129:2711–22.
338. Williams P, Warwick R, Dyson M, et al. (1995) Gray's anatomy, 31st ed. New York: Churchill Livingstone
339. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2002) Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 287: 2563–9.
340. Xi Y, Nette EG, King DW, Rosen M. (1982) Age-related changes in normal basement membranes. *Mech Ageing Dev* 19: 315–34.

341. Yagihashi S. (1997) Nerve structural defects in diabetic neuropathy: do animals exhibit similar changes? *Neurosci Res Commun* 21: 25–32.
342. Ylitalo KR, Sowers M, Heeringa S. (2011) Peripheral Vascular Disease and Peripheral Neuropathy in Individuals With Cardiometabolic Clustering and Obesity: National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2004. *Diabetes Care* 34(7): 1642–7.
343. Yoshida D, Kim K, Noha M, Teramoto A. (2006) Anti-apoptotic action by hypoxia inducible factor 1-alpha in human pituitary adenoma cell line, HP-75 in hypoxic condition. *J Neurooncol* 78: 217–25.
344. Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M. (2002) 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Res* 2002; 949: 202–8.
345. Yurchenco PD. (2011) Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004911.
346. Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 22:521–38.
347. Yurchenco PD, Cheng YS. (1994) Laminin self-assembly: a three-arm interaction hypothesis for the formation of a network in basement membranes. *Contrib Nephrol* 107:47–56.
348. Zacchigna S, Ruiz de Almodovar C, Carmeliet P. (2008) Similarities between angiogenesis and neural development: What small animal models can tell us. *Curr Top Dev Biol* 80: 1–55.
349. Zeisberg M, Neilson EG. (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 1819–34.
350. Zhang Y, Luo H, Zhang Z, Lu Y, Huang X, Yang L, Xu J, Yang W, Fan X, Du B, et al. (2010) A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 31: 5312–24.
351. Zuo J, Hernandez YJ, Muir D. (1998) Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. *J Neurobiol* 34(1):41–54.

Биографија аутора

Браца Кундалић је рођен 26. јануара 1981. године у Нишу. Основну и средњу школу завршио је у Нишу с одличним успехом. Студије медицине на Медицинском факултету Универзитета у Нишу уписао је 1999. године и дипломирао 2006. године с просечном оценом 8,86. У школској 2006/07. години уписао је докторске академске студије, смер молекуларна медицина, на Медицинском факултету Универзитета у Нишу. Након обављеног лекарског стажа положио је стручни испит 2007. године. У току шест семестара на докторским студијама положио је све испите, с просечном оценом 10.

Радни однос на Медицинском факултету Универзитета у Нишу засновао је марта 2008. године у звању сарадника у настави на предмету Анатомија. Од септембра 2008. до јуна 2009. године био је на служењу цивилног војног рока. У звање сарадника у настави реизабран је у децембру 2009. године. Након годину дана изабран је у звање асистента. Октобра 2013. поново је изабран у исто звање, у коме се и сада налази.

Члан је Српског анатомског друштва Србије, Српског лекарског друштва и Лекарске коморе Србије.

Служи се енглеским језиком.

Прилог 4: Изјаве аутора докторских дисертација

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

„Морфолошка, морфометријска и имунохистохемијска анализа промена
везивоткивних омотача хуманог суралног нерва у току старења“

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

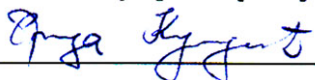
- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 7.5.2015.

Аутор дисертације: Браца Кундалић

Потпис аутора дисертације:



Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА ДОКТОРСKE
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Браца Кундалић

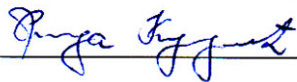
Наслов дисертације: Морфолошка, морфометријска и имунохистохемијска анализа промена
везивноткивних омотача хуманог суралног нерва у току старења

Ментор: Проф. др Слађана Угреновић

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.**

У Нишу, 7.5.2015.

Потпис аутора дисертације:



Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

„Морфолошка, морфометријска и имунохистохемијска анализа промена
везивоткивних омотача хуманог суралног нерва у току старења“

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста).

У Нишу, 7.5.2015.

Аутор дисертације: Браца Кундалић

Потпис аутора дисертације:

Браца Кундалић