



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**Владимир С. Живковић**

**Морфометријска и имунохистохемијска анализа  
удружености структурних промена са  
дистрибуцијом псамома телашаца у хороидним  
плексусима можданих комора током старења  
човека**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2016. година





UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Vladimir S. Živković**

**Morphometric and immunohistochemic analysis of  
structural changes in relation to psammoma bodies  
distribution in cerebral ventricles' choroid plexus  
with age in humans**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.



**Ментор:**

Редовни професор, проф. др Раде Чукурановић  
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

**Наслов докторске дисертације:**

Морфометријска и имунохистохемијска анализа удружености структурних промена са дистрибуцијом псамома телашаца у хороидним плексусима можданих комора током старења човека

**Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:**

1. Ванредни професор, проф. др Иван Јовановић, председник  
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
2. Редовни професор, проф. др Раде Чукурановић, ментор и члан  
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
3. Редовни професор, проф. др Бранислав Филиповић, члан са МФ у Београду  
Универзитет у Београду, Медицински факултет

Датум одбране: \_\_\_\_\_



## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Проф. др Раде Чукурановић, редовни професор Медицински факултет, Универзитет у Нишу
Наслов:	Морфометријска и имунохистохемијска анализа удружености структурних промена са дистрибуцијом псамома телашаца у хороидним плексусима можданих комора током старења човека
Резиме:	<p>Током процеса старења долази до значајних морфолошких и функционалних промена у хороидним плексусима можданих комора човека. Стварање псамоматозних телашаца је уочено већ код млађих особа, и сматра се физиолошком последицом старења. Морфолошком и морфометријском методом анализирани су узорци хороидних плексуса све четири мождане коморе, добијени на аутопсији. Хистохемијском и имунохистохемијским методама испитивана је структура хороидног плексуса, изглед његовог епитела, као и дистрибуција и карактеристике псамоматозних телашаца, у функцији старења. Осим тога анализирана је дистрибуција експресије CD44, CD68, остеопонтин и окстеокалцин.</p> <p>Резултати овог истраживања су показала да долази до значајних структурних промена на нивоу хороидног плексуса током процеса старења. Смањује се разгранатост хороидног плексуса и његова прокрвљеност. Епител је измењен, са појавом високих куполастих ћелија, спљоштених вретенастих или крупних ћелија потпуно испуњених садржајем. У старијој животној доби, уочене су веће групације псамоматозних телашаца, често унутар цистичних структура, чији се број и величина повећава са годинама. Повећана експресија остеопонтин у псамоматозним телашцима је карактеристика млађе животне доби, за разлику од окстеокалцин чија се експресија прогресивно повећава са старењем. Стварање псамоматозних телашаца и њихове карактеристике, су у корелацији са променама на епителу и у структури хороидног плексуса током старења човека.</p> <p>Уочене старосне промене хороидног плексуса и карактеристика псамоматозних телашаца, с обзиром на значај хороидног плексуса у хомеостази централног нервног система, могу помоћи у разјашњавању механизма настанка функционалних поремећаја мозга повезаних са старењем.</p>
Научна област:	медицина
Научна дисциплина:	анатомија
Кључне речи:	псамоматозна телашца, хороидни плексус, старење, хистохемија, имунохистохемија, морфометрија, CD44, CD68, остеопонтин, окстеокалцин
УДК:	611.018.8:577.24(043.3)

CERIF  
класификација:

B440 Анатомија и морфологија човека

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

*CC BY-NC-ND*



## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. dr Rade Ćukuranović University of Niš, School of Medicine
Title:	Morphometric and immunohistochemic analysis of structural changes in relation to psamomma bodies distribution in cerebral ventricles' choroid plexus with age in humans
Abstract:	<p>During the ageing process, numerous structural and functional changes occur in the cerebral ventricles' choroid plexus. The formation of psamomma bodies starts at an early age, and is considered a physiological consequence of the ageing process.</p> <p>Using histochemical and immunohistochemical methods, autopsy samples of choroid plexus of all four cerebral ventricles were analyzed morphologically and morphometrically. The structure of the choroid plexus, its epithelium morphology, as well as the distribution and characteristics of the psamomma bodies, were investigated in this study. Besides, the expression of CD44, CD68, osteopontin and osteocalcin, was analyzed.</p> <p>The results of this study showed significant structural changes in choroid plexus during ageing. Choroid plexus arborification and its blood vessels density is reduced. The epithelium changed with presence of high domed, flattened spindle, or large cells expanded by its content. Psamomma bodies in the elderly formed large groups, often inside cysts, and showed an increase in their number and size. Increased osteopontin expression is characteristic younger population choroid plexus, unlike osteocalcin whose expression progressively increases with age. Psamomma bodies formation and their characteristics are in correlation with changes in the structure of the choroid plexus and its epithelium, during the ageing process in humans.</p> <p>After taking into consideration the role of choroid plexus in the central nervous system homeostasis regulation, the stated changes in ageing choroid plexus and psamomma bodies characteristics, may contribute to the revealing of the mechanism of functional impairment of the brain in the elderly.</p>
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Anatomy
Key Words:	psamomma bodies, choroid plexus, ageing, histochemistry, immunohistochemistry, morphometry, CD44, CD68, osteopontin, osteocalcin
UDC:	611.018.8:577.24(043.3)
CERIF Classification:	B440 Human anatomy and morphology

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

## САДРЖАЈ

<b>1. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ХОРОИДНИ ПЛЕКСУС .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. АНАТОМИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. ЕМБРИОНАЛНИ РАЗВОЈ ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА .....	6
<b>1.3. ХИСТОЛОГИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА .....</b>	<b>7</b>
1.3.1. ЕПИТЕЛ ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА.....	8
1.3.2. СТРОМА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА.....	11
1.3.2.1. Имуње ћелије хороидног плексуса .....	12
1.3.2.2. Популација CD68 позитивних ћелија у хороидном плексусу .....	14
1.3.2.3. Популација CD44 позитивних ћелија у хороидном плексусу .....	16
<b>1.4. ФИЗИОЛОГИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА.....</b>	<b>17</b>
1.4.1. СЕКРЕЦИЈА ЦЕРЕБРОСПИНАЛНЕ ТЕЧНОСТИ .....	18
1.4.2. ИНФЛУКСНА ТРАНСПОРТНА ФУНКЦИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА .....	21
1.4.3. ЕФЛУКСНА (РЕАПСОРПТИВНА) ТРАНСПОРТНА ФУНКЦИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА .....	23
1.4.4. ПРОИЗВОДЊА БИОАКТИВНИХ ПЕПТИДА И ФАКТОРА РАСТА У ХОРОИДНОМ ПЛЕКСУСУ .....	24
<b>1.5. ПАТОЛОГИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА.....</b>	<b>26</b>
<b>1.6. ХОРОИДНИ ПЛЕКСУС КАО ДЕО НЕУРОИМУНОГ СИСТЕМА.....</b>	<b>30</b>
1.6.1. ХОРОИДНИ ПЛЕКСУС - СЕЛЕКТИВНО АКТИВНА КАПИЈА ЗА ЛЕУКОЦИТЕ .....	33
1.6.2. НЕУРОИМУНОЛОГИЈА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА И СТАРЕЊЕ.....	35
<b>1.7. СТАРЕЊЕ .....</b>	<b>37</b>
1.7.1. ТЕОРИЈЕ СТАРЕЊА.....	39
1.7.2. ПРОМЕНЕ НА МОЗГУ ТОКОМ СТАРЕЊА.....	43
1.7.3. ПРОМЕНЕ ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА ПОВЕЗАНЕ СА СТАРЕЊЕМ .....	46
1.7.3.1. Морфолошке промене хороидног плексуса .....	47
1.7.3.2. Функционалне промене хороидног плексуса.....	48
<b>1.8. ПСАМОМАТОЗНА ТЕЛАШЦА.....</b>	<b>51</b>
1.8.1. БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЈА И ЕКТОПИЧНА КАЛЦИФИКАЦИЈА.....	51
1.8.2. ПАТОГЕНЕТСКИ МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА ПСАМОМАТОЗНИХ ТЕЛАШЦА .....	54
1.8.2.1. Улога остеопонтина у биоминерализацији .....	58

1.8.2.2. Улога остеокалцина у биоминерализацији.....	60
1.8.2.3. Улога нанобактерија у биоминерализацији .....	62
1.8.3. ПСАМОМАТОЗНА ТЕЛАШЦА У НЕНЕОПЛАСТИЧНИМ СТАЊИМА .....	64
1.8.4. ПСАМОМАТОЗНА ТЕЛАШЦА У НЕОПЛАСТИЧНИМ СТАЊИМА .....	65
<b><u>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....</u></b>	<b>69</b>
<b><u>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</u></b>	<b>71</b>
<b>3.1. МАТЕРИЈАЛ.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2. МЕТОДЕ .....</b>	<b>71</b>
3.2.1. АНАТОМСКА МИКРОДИСЕКЦИЈА .....	71
3.2.2. ХИСТОЛОШКА ОБРАДА ТКИВА.....	72
3.2.2.1. Хистохемијске методе .....	73
3.2.2.2. Имунохистохемијске методе .....	73
3.2.3. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА .....	75
3.2.3.1. Стереолошка анализа хистохемијских препарата .....	75
3.2.3.2. Астереолошка анализа епитела хороидног плексуса .....	76
3.2.4. СТАТИСТИЧКЕ МЕТОДЕ .....	78
<b><u>4. РЕЗУЛТАТИ.....</u></b>	<b>79</b>
<b>4.1. МОРФОЛОШКА АНАЛИЗА .....</b>	<b>79</b>
4.1.1. ХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА.....	79
4.1.2. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА .....	82
4.1.2.1. Имунохистохемијска анализа експресије CD68 .....	82
4.1.2.2. Имунохистохемијска анализа експресије CD44 .....	83
4.1.2.3. Имунохистохемијска анализа експресије остеопонтин у псамоматозним телашцима .. .....	85
4.1.2.4. Имунохистохемијска анализа експресије остеокалцина у псамоматозним телашцима .. .....	93
<b>4.2. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА.....</b>	<b>96</b>
4.2.1. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА И ЊЕГОВОГ ЕПИТЕЛА .....	96
4.2.2. МОРФОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ПСАМОМАТОЗНИХ ТЕЛАШАЦА .....	109
4.2.3. УТИЦАЈ МОРФОМЕТРИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ПСАМОМАТОЗНИХ ТЕЛАШАЦА, ПОЛА И СТАРОСТИ НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ХОРОИДНОГ ПЛЕКСУСА И ЊЕГОВОГ ЕПИТЕЛА... .....	117

---

---

4.2.4. Морфометријска анализа псамоматозних телашаца у односу на имунопозитивност реакције на остеопонтин .....	125
4.2.5. Морфометријска анализа псамоматозних телашаца у односу на имунопозитивност реакције на остеокалцин .....	130
<b><u>5. ДИСКУСИЈА.....</u></b>	<b><u>137</u></b>
<b><u>6. ЗАКЉУЧАК.....</u></b>	<b><u>175</u></b>
<b><u>7. ЛИТЕРАТУРА.....</u></b>	<b><u>179</u></b>
<b><u>БИОГРАФИЈА АУТОРА .....</u></b>	<b><u>203</u></b>



## 1. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 1.1. Хороидни плексус

Хороидни плексуси су мултилобулисани, разгранате, високо васкуларизоване, модификоване епителне структуре, које се пројектују у лумен можданих комора. Латински назив *plexus chorooides* настао је усвајањем грчких речи *chorion*, у значењу „мембрана која окружује фетус“ и *plexus*, што значи мрежа, испреплетана структура (Suzuki и сар, 1936). Први опис „мождане воде“ дали су древни Египћани још пре 2700 година, док је откриће хороидног плексуса (ХП) Гален приписао Herophilus-у (335-280.г. п.н.е). У доба ренесансе Андреас Версалиус дао је невероватно прецизан опис хороидног плексуса и можданих комора. Он је такође израчунао да воденаста течност која тече кроз шупљине и око мозга чини око једне шестине укупног волумена мозга (Clarke и Dewhurst, 1972). Студија људског мозга помоћу магнетне резонанце открила је да цереброспинална течност (ЦСТ) заузима 18% укупне запремине мозга (Luders и сар, 2002), што значи да је Версалиус био невероватно прецизан у својој процени. До XVII века већ су била описана сва четири хороидна плексуса. Пре скоро стотину година Харви Кушинг дошао је до есенцијалног открића да хороидни сплетови, високо васкуларизоване структуре лоциране у свакој од можданих комора, секретују ЦСТ (Cushing, 1914).

Док макроскопски изглед хороидног плексуса (ХП) благо варира у зависности од локализације, ултраструктурна морфологија ХП је веома слична (Smith и сар, 2004). Хороидни плексус грађен је од централне строме покривене једнослојним, поларизованим епителом. Строма је веома васкуларизована и сачињена од крвних судова, везивног ткива и перицита. Крвни судови су фенестрираног типа и пропустљиви, чиме се разликују од крвних судова можданог паренхима, који су повезани тесним везама и формирају крвно-мождану баријеру. Уместо баријере на нивоу крвних судова, ћелије епитела хороидног плексуса су те које су повезане континуалним тракама тесних међућелијских спојева, ограничавајући улазак молекула нерастворљивих у масти у

церебрспиналну течност (ЦСТ). Дакле, на нивоу хороидног плексуса успоставља се крвно-ликворна баријера (Johansson , 2014, Ек и сар, 2003)

Хумани хороидни плексус је саставни део система који је одговоран за формирање, циркулацију и одстрањивање церебрспиналне течности. Овај систем се састоји из шест компоненти: церебрспинална течност (ЦСТ), хороидни плексуси (ХП), циркулаторни простор ЦСТ, ендотел церебралних капиlara, интерстицијална течност мозга и арахноидални вилуси (Rubenstein, 1998). Укупна запремина ЦСТ у централном нервном систему (ЦНС) човека износи око 150мл, а 500 до 600мл произведе се свака 24 часа, што значи да се ЦСТ обнови три до четири пута дневно (Cserr, 1971). Епител хороидног плексуса је секреторни епител изузетних својстава, са јединственим ћелијским транспортним механизмима. Ћелије епитела ХП секретују ЦСТ по стопи од 0,4мл/мин./г ткива, што је секретциони капацитет коме могу по ефикасности да парирају само проксимални тубули бубрега и дуктуси панкреаса (Damkier и сар, 2013). Данас је прихваћен став да хороидни плексуси све четири мождане коморе секретују око 80% ЦСТ, док преосталих 20% потиче из интерстицијалне течности мозга која се филтрира кроз крвно-мождану баријеру (Redzic и сар, 2005). При том, површина хороидног плексуса износи око 0,021м<sup>2</sup>, што чини само 0.1% укупне површине крвно-мождане баријере и, чак и када се ова површина повећа и до 50 пута на основу екстензије површине луминалним микровилима, она чини несразмерно мали део крвно-мождане баријере у односу на величину своје секреторне улоге (Dohrmann и Вусу, 1970, Damkier и сар, 2013).

Поред секреције највећег дела ЦСТ, ХП обезбеђује и присуство храњивих молекула, попут витамина и транстиретина који из ликвора пенетрирају дубоко у мождани паренхим. Поред тога, ХП функционише и као одводни пут и ослобађа ЦСТ поларизованих ендогених и егзогених молекула који мозгу више нису потребни и многих клинички значајних супстанци, као што је пеницилин. ХП не само да производи ЦСТ који ЦНС-у пружа механичку заштиту и амортизујућу потпору, већ константно снабдева мозак свежим ликвором, омогућавајући одржавање јонске и молекуларне хомеостазе. ЦНС се не може одржавати и не може постојати без ХП и ЦСТ и виталних транспортних система које обезбеђују, као што су допремање фолата или витамина С мозгу (Miller, 2004; Spector и Johanson, 2014).



Деценијама ХП представља предмет истраживања на пољу епителног транспорта, ћелијске биологије, ћелијске поларизације и неуронаука, пре свега због своје улоге у стварању ЦСТ и упечатљиве различитости епитела ХП у односу на остале епителе људског тела. Упркос његовом веома раном открићу, функције ХП још увек нису у потпуности расветљене. Иако је ХП јединствен по својој морфологији и функцији, број студија које су се бавиле истраживањем ХП заправо је несразмерно мали у односу на целокупну истраживачку активност (Lehtinen и сар, 2013). Већина студија, базираних на широком спектру методолошких приступа, превасходно се бавила истраживањем доминантне улоге ХП у секрецији ЦСТ. Данас је познато да ХП има бројне и разноврсне функције још од свог настанка у раној ембриогенези, као и да се те улоге мењају и сазревају, заједно са променама структуре и функције целокупног ЦНС-а. Недавна истраживања недвосмислено потврђују да је ХП активни учесник у динамичном систему регулације неуралних матичних ћелија, критичним периодима развоја ЦНС-а и свеукупном здрављу и целовитој равнотежи нервног система. Учесће ХП у формирању крвно-ликворне баријере, секрецији и пречишћавању ЦСТ, генерисању интракранијалног притиска, одржавању јонске хомеостазе ЦСТ, обезбеђивању микронутријента, протеина и хормона неопходних за развој, одржавање и функцију неурона и глије сада добијају разјашњења и спознају на молекуларном нивоу. Систем ХП – ЦСТ активно координира развојем и здрављем ЦНС-а. Поремећај функције ХП доводи до тешких неуролошких поремећаја, а, са друге стране, очуван и функционалан ХП може бити актер и доприносити патогенези бројних патолошких поремећаја и стања (Damkier и сар, 2013; Spector и сар 2015).

## 1.2. Анатомија хороидног плексуса

Хороидни плексуси представљају папиломатозне структуре које леже у вентрикуларном систему мозга: по један у свакој од бочних можданих комора, један у трећој и један у четвртој комори У мозгу одрасле особе, највећи део ових разгранатих, листоликих структура плута у ЦСТ коморних шупљина мозга. Њихова спољашња морфологија благо варира у зависности од њихове локализације у мозгу. Макроскопски, ХП бочних комора имају облик тананог, листоликог, таласатог вела, док је ХП четврте коморе лобулисаног изгледа и масивније грађе. ХП треће мождане коморе је мањих

димензија од осталих и интермедијарног изгледа (Strazielle и Ghersi-Egea 2000). Четири ХП заједно граде главни део крвно-ликворне баријере мозга. Остатак крвно-ликворне баријере чине циркумвентрикуларни органи и арахноидална мембрана. Крвно-ликворна баријера базира се на једнослојном епителу са тесним међућелијским везама који ограничава приступ већини супстанција можданом паренхиму, док се капиларни ендотел одликује значајном пропустљивошћу, који је у случају ХП фенестрираног типа. Крвно-ликворна баријера разликује се од крвно-мождане баријере, коју формира тесно повезан ендотел капилара церебралних крвних судова, одвајајући интраваскуларни простор од интерстицијалне течности мозга (Damkier и сар, 2013).

ХП се развијају са унутрашњег зида сваке од бочних можданих комора и са крова треће и четврте мождане коморе. ХП је присутан у свим сегментима вентрикуларног система, изузев у можданом акведукту (*aqueductus mesencephali Sylvii*), који повезује трећу и четврту мождану комору и у фронталном и окципиталном рогу латералних комора мозга. ХП треће коморе или плексус *Vicq d' Azyr*-а локализован је на њеном крову и подељен је на два дела тракастог облика, која се пружају у сагиталном правцу дуж једне и друге стране средишње линије крова III мождане коморе, досежући до десног и левог Монроовог интервентрикуларног отвора. ХП у континуитету даље пролазе кроз интервентрикуларне отворе и настављају да се пружају као хороидни сплет бочне коморе, дуж хороидне фисуре унутрашњег зида, централног дела бочне мождане коморе, све до њеног темпоралног рога (Strazielle и Ghersi-Egea 2000). Хороидни плексус бочне коморе има облик таласастог вела, који на споју централног дела и задњег рога увећава своју површину дајући формацију која се означава као гломус. У њему се налазе анастомозе између предњих и задњих хороидних артерија. На крову четврте коморе налазе се још два мања ХП, која имају претежно лобулирани изглед (Kahle и Frotscher, 2011).

Највећи део ХП се код људи и осталих сисара налази у левој и десној бочној и IV можданој комори. Њихова величина је приближно једнака, док је ХП III мождане коморе најмањи и чини једну десетину ХП мозга. Укупна тежина ХП код човека износи свега 2-3 грама, што чини око 0,25% укупне тежине мозга, с обзиром на то да је мозак одрасле особе просечне тежине око 1300 грама (Emerich и сар, 2004, 2005). Макроскопски, ХП има изглед разгранате крошње дрвета, са бројним папилоликим наборима. Оваква арборизована структура обезбеђује да ХП има велику површину у односу на своје

димензије. Свака од грана садржи један или више крвних судова, типа артерија, капилара и венских каверни са танким зидовима, окружених танким слојем растресито распоређених колагених влакана. Површину облаже једнослојни кубични епител који се при основи плексуса наставља на епендим комора. Линија припоја ХП се означава као тения. Тако се у бочној комори ХП припаја дуж форникса, тј. фимбрије хипокампуса (*taenia fornicis*) и дуж ламине афиксе (*taenia choroidea*). На крову треће коморе, лептоменинге (*pia mater, arachnoidea mater*) формирају дупликатуру која се означава као хороидна тела и која је разапета између унутрашње стране десне и леве хемисфере великог мозга. Линија припоја њене бочне ивице пружа се дуж медуларне стрије, на граници између унутрашње и горње стране таламуса и означава се као *taenia thalami*. Из те дупликатуре проминира у лумен III коморе ХП. У IV комори сплет се састоји из хороидне теле, у чији састав улази дупликатура пие матер, али не и арахноиде, која не облаже доњу страну малог мозга, већ се пребацује директно на дорзалну страну продужене мождине и формира церебеломедуларну цистерну. ХП четврте мождане коморе проминира са хороидне теле у шупљину коморе (Kahle i Frotscher, 2011).

**Васкуларизација и инервација ХП.** ХП се крвљу снабдева из унутрашње каротидне артерије и вертебралне артерије. ХП бочних можданих комора васкуларизује предња хороидна артерија, која се преко медијалне церебралне артерије грана из *arteriae carotis internae*, и задња хороидна артерија, која је пак грана вертебралне артерије, од које се одваја преко постериорне церебралне артерије. Задња хороидна артерија обезбеђује артеријску васкуларизацију и ХП треће мождане коморе. Посткомуникантни део задње мождане артерије васкуларизује својим задње унутрашњим хороидним гранама ((*rami choroidei posteriores mediales*) ХП треће мождане коморе, док његове задње спољашње хороидне гране (*rami choroidei posteriores laterales*) васкуларизују део хороидног сплета бочне мождане коморе. Хороидни плексус четврте мождане коморе је васкуларизован од стране хороидне гране (*ramus choroideus ventriculi quarti*) задње доње маломождане артерије, која је бочна грана вертебралне артерије. Венска крв се из ХП дренира преко две вене: горње хороидне вене (*V. choroidea superior*), која је притока Гален-ове вене (*V. magna cerebri*) и доње хороидне вене (*V. choroidea inferior*), која је притока базалне вене (*V. basalis*) (Damkier и сар, 2013; Netter, 2014).

ХП се одликује високом стопом перфузије, са протоком од 4мл/мин. на грам ткива хороидног сплета, што је око 10 пута већа стопа од прокрвљености можданог

паренхима (Keer и Jones, 1990). Проток крви кроз ХП контролише симпатички нервни систем путем влакана која полазе из горњег вратног ганглиона. Капилари ХП поседују  $\alpha$  и  $\beta_2$  адренергичке рецепторе, а стимулација ових рецептора узрокује вазоконстрикцију, односно вазодилатацију. Са друге стране, епителне ћелије садрже  $\beta_1$  рецепторе, након чије стимулације долази до пада стопе секреције цереброспиналне течности. Парасимпатичка инервација долази до крвних судова и епитела преко холинергичких влакана глософарингеалног нерва и вагуса. Парасимпатичка стимулација смањује стварање ЦСТ, вероватно путем смањења активности  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -азе посредством азот оксида. Хороидни плексус је због обилне сензитивне инервације болно осетљив. Сензитивна инервација потиче од тригеминалног и вагусног нерва, док аутономна влакна потичу од горњег вратног ганглиона симпатичког стабла (Kahle и Frotscher, 2011; Ellis и сар, 2000).

### *1.2.1. Ембрионални развој хороидног плексуса*

ХП развија се из продужетака епендимног омотача можданих комора почев од 6. недеље гестације. ХП има двојно ембрионално порекло: епител ХП је ектодермалног, а централна строма мезодермалног порекла (Catala, 1998). Најпре се развија ХП четврте мождане коморе, затим ХП латералних и на крају треће коморе. Након ембрионалне спецификације, зачетак ХП пролази кроз карактеристично истањење епитела, где од псеудостратификованог постаје прави једнослојни епител који почиње да инвагинира у коморе (Dziegielewska и сар, 2001). Већина ћелија епитела ХП су пост-митотске ћелије и урастање плексуса у коморе одвија се кроз додавање ћелија из пролиферативне зоне у корену ХП, чиме се током развоја повећава величина ХП (Liddelov и сар, 2010). Строма ХП са органотопичним фенестрираним крвним судовима индукована је зачетком ХП. Елементи строме постају функционално неодвојиве компоненте епителног зачетка ХП, обезбеђујући неопходне сигнале за даље сазревање епителних ћелија. Гашење *Sonic hedgehog* сигналног пута, који у току нерогенезе обезбеђују стромалне прогениторне ћелије и перипити ХП, доводи до поремећаја у развоју ХП, који је редуковане величине и неадекватно васкуларизован (Nielsen и Dymecki, 2010).

Код човека, хороидни сплетови се јављају веома рано током ембрионалног развоја, у периоду између шесте и осме недеље. Почев од тог периода, па све до

седамнаесте недеље, они представљају доминантне структуре у коморама, у којима заузимају и до 63% вентрикуларне запремине. Касније, њихова запремина опада, тако да код одраслих они не заузимају више од 10% вентрикуларне запремине (Dohrmann, 1970).

У одраслом организму ХП има неколико основних функција, а две од њих обавља још у току феталног развоја мозга: заштита и регулација унутрашње средине мозга путем крвно-ликворне баријере и секреција ЦСТ и модулација њеног састава активношћу хороидног епитела. Међутим, током развоја мозга хороидни плексус није компетентан да обавља функцију уклањања отпадних и метаболичких продуката. Са друге стране, сматра се да током неурогенезе хороидни плексус има и додатне улоге, као што је стварање експанзивног притиска путем секреције ЦСТ (Johansson и сар, 2008). У току ембрионалног и феталног развоја, хороидни плексуси у ЦСТ секретују велики број морфогена, митогена и трофичких фактора који управљају растом ЦНС-а. Тако нпр. инсулину сличан фактор раста 2 (IGF-2), секретован од стране ХП, делује на рецепторе локализоване на поду III коморе, те тако управља растом спиналних аксона. Слит протеини, које секретује ембрионални ХП, доводе до радијалне миграције церебралних кортикалних неурона из вентрикуларне и субвентрикуларне зоне у кортикалну плочу. Дакле, за време развоја ЦНС-а ХП функционише као важан извор сигнала развоја и сазревања (Strazielle и Ghersi Egea, 2000; Lun и сар, 2015).

### 1.3. Хистологија хороидног плексуса

Хороидни плексуси се карактеришу униформном микроскопском структуром, која не зависи од локализације ХП и релативно је једноставна. На пресеку, они се састоје из једнослојног кубичног или нискоцилиндричног епитела повезаног тесним везама, који лежи на базалној мембрани и окружује васкуларну мрежу строме. При томе, он прави наборе и формира структуре које на пресеку имају изглед листа папрати (Smith и сар, 2004; Strazielle и Ghersi-Egea, 2000). Код ових структура се разликује базални део, којим је ХП повезан са зидом коморе, и дистални део, који штрчи у њен лумен гранајући се у велики број вилуса. Испод епитела налази се везивно-ткивна строма, у којој су смештени крвни судови. У базалном делу ХП заступљени су крвни судови по типу артериола, а у дисталном делу – по типу капила. Везивно ткиво строме је развијеније у базалном делу ХП, док је код вилуса оно сведено на танак појас између крвног суда и

базалне ламине епитела. Епител базалног дела ХП се наставља у околним епендимским коморама (Dohrmann, 1970).

### *1.3.1. Епител хороидног плексуса*

Епител ХП представља посебан ћелијски тип, јединствен је унутар ЦНС-а по свом великом секреторном и транспортном капацитету. Основно својство хороидних епителних ћелија је да су структурално и функционално поларизоване. Епителне ћелије ХП се сматрају за модификовани епендим, али показују низ посебних и специфичних својстава (Emerich и сар, 2004). Епител ХП чине кубичне или нискоцилиндричне ћелије, са просечном висином до 15 $\mu$ m (Serot и сар, 2003). Хороидни плексуси бочне, III и IV моздане коморе садрже просечно 107 милиона хороидних епителних ћелија код мушкараца, док је код жена тај број нешто мањи и износи 96 милиона. Просечна ареа хороидног епитела износи 213 $\text{cm}^2$  (Dohrmann, 1970). Ове епителне ћелије су у нивоу латералне мембране ближе апикуларној, луминалној полу ћелије повезане тесним међућелијским везама, на апикуларној површини имају четкасти покров, а на базолатералној мембрани формирају се бројне интердигитације (Wolburg и Paulus, 2010).

**Плазма мембрана хороидних епителних ћелија.** С обзиром на изразиту поларизовану ултраструктуру епителних ћелија ХП, на плазма мембрани описују апикуларну или вентрикуларну, и базолатералну пол. На апикуларној полу се уочава четкаста, кутукуларна мембрана, са бројним испреплетаним микровилима, међу којима се уочавају ретке цилије, чији број зависи од врсте организма (Dohrmann, 1970; Scott и сар, 1974). Микровили представљају наставке апикуларне плазма мембране и њихов облик варира од правилних прстоликих наставака до оних који апикуларно поседују везикуларне израстине. Цилије, које се уочавају између испреплетаних микровила, према Scott-у и сар. (1974) имају улогу покретања слојева ЦСТ који се налазе непосредно уз хороидни епител. Цилије су сачињене од девет паоваи микротубула на периферији и једог централног пара. Сматра се да на површини сваке епителне ћелије постоји једна главна, примарна цилија или кластер мањих покретних цилија (Banizs и сар, 2005). Структурни дефекти цилија узрокују хидроцефалус услед повећања продукције ЦСТ (Swiderski и сар, 2012). Експериментално уклањање цилија хлор хидратом узрокује пораст

транскитозе у култури ћелија ХП, што указује на то да ове структуре имају важну сензорну функцију (Narita и сар, 2010). У експерименталној студији на мишевима са мутацијом која узрокује дефектну функцију цилија, забележене су драматичне промене функције ХП, укључујући промене интрацелуларног сАМР, рН, састава ЦСТ и развој хидроцефалуса (Banizs и сар, 2005). Молекуларни механизми цилијарне функције још увек нису у потпуности расветљени, али се сматра да покретне цилије спречавају таложење слојева на вентрикуларној површини ХП епитела, док примарна цилија има улогу осмосензора и/или хемосензора (Damkier и сар, 2013).

Микровили повећавају површину апикалног покрива хороидног епитела неколико десетина пута (Cornford и сар, 1997). Тако, у складу са новијим проценама, површина хуманог хороидног епитела износи 2-5м<sup>2</sup>, што је далеко више од традиционално опсване површине од 0,021м<sup>2</sup> (Dohrmann, 1970). Нажалост, ова старија, минимална цифра константно је коришћена у литератури за поређење са површином хемато-енцефалне баријере (око 10м<sup>2</sup>), те је на тај начин у огромној мери потцењиван потенцијални значај ХП на транспорт супстанција у ЦНС-у (Tang и сар, 2014).

Базолатерални пол плазма мембране карактерише се бројним наборима и интердигитацијама, што значајно доприноси увећању површине хороидног епитела. Додатно, на латералној мембрани, ближе апикалном полу, уочава се присуство чврстих спојних комплекса између епителних ћелија, по типу дезмозома и нешто ређе зонуле адхеренс, док оклудентне везе обезбеђују баријерну функцију ХП и спречавају пролазак хидросолубилних молекула из крви у ЦСТ парацелуларним путем (Dohrmann, 1970; Redžić и Segal, 2004). Тесне везе којима се повезују епителне ћелије ХП експримирају неколико молекула из протеинске фамилије клаудина (Will и сар, 2008). Снажна експресија клаудина 2 и 11 у тесним везама ХП, чини их веома сличним епителу проксималних тубула бубрега, који су изразито пермеабилни за воду. Зато се ХП веома често пореди са проксималним тубулима, у смислу проласка велике количине течности кроз епител, додуше, у супротним смеровима. За разлику од епителних ћелија ХП, епендимне ћелије, које облажу зидове комора, међусобно су повезане уз помоћ само неколико спојних комплекса, што омогућава несметану комуникацију између междане интерстицијалне течности и ЦСТ, нарочито преко периваскуларних путања. У саставу коморног система мозга постоје региони са епендимом, који поседује спојне комплексе између ћелија, сличне онима код хороидног епитела. Те зоне се означавају као

циркумвентрикуларни органи. Циркумвентрикуларни органи обухватају сензорне и секреторне органе који, са изузетком субкомисуралног органа, садрже екстензивну васкуларну мрежу сачињену од фенестрираних капилара. Услед веће пропустљивост можданих капилара, хидрофилни молекули, међу којима и хормони, лакше доспевају до неурона, а неки од ових органа и сами секретују хормоне и гликопротеине у периферну циркулацију, те се претпоставља се ове зоне чине основу ендокринолошке негативне повратне спреге (Ganong, 2000; Venaroch, 2011).

Епител ХП садржи широк спектар транспортерских молекула. Они су асиметрично распоређени између апикалне и базолатералне мембране, указујући на укљученост у векторски пренос молекула између два супротна пола епителне ћелије. Секреторни инфлукс јона у ЦСТ у великој мери превазилази реапсорптивни ефлукс јона из комора, а последица ове разлике је стварање ЦСТ. Јонски транспортери и канали на четкастом покрову укључују молекуле одговорне за транспорт  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , који учествују у процесу филтрације и хомеостазе ЦСТ (Damkier и сар, 2013; Spector и Johanson, 2010).

**Једро хороидних епителних ћелија.** Једро епителних ћелија ХП је округло, лоцирано у средишњем делу ћелије или ближе базалном полу (Serot и сар, 2003). Обавијено је двоструком мембраном на којој се уочавају поре. Број једараца варира, али никада није већи од три.

**Цитоплазма хороидних епителних ћелија.** У цитоплазми епителних ћелија ХП присутан је велики број митохондрија, што говори у прилог њиховој великој метаболичкој активности и високим енергетским захтевима за трансепителни транспорт. Митохондрије чине до 15% запремине епителне ћелије и дистрибуиране су у апикалном и базалном делу цитоплазме. Најгушће су у пределу апикалног четкастог покроба, вероватно да би обезбеђивале енергијом бројне секреторне механизме (нпр, за пептиде као што су фибробластни фактор раста 2, аргинин, вазопресин, инсулину сличан фактор раста II и протеине: транстиретин, цистатин Ц и везујући протеин за инсулину-сличан фактор раста II), као и реапсорптивне транспортере који регулишу концентрацију супстанција попут јодида, калијума и аминокиселина у ЦСТ. Дужина митохондрија износи 400-600нм, а ширина 200-300нм. Као и код осталих ћелија организма, карактеришу се присуством двоструке мембране, која у њиховој унутрашњости формира кристе (Cornford и сар, 1997; Spector и сар, 2015).



Голци апарат је локализован у бочним и деловима цитоплазме епителних ћелија према вентрикуларном лумену. Састоји се из низова цистерни и везикула, које се налазе перинуклеарно. Неке од везикула су богате феритином, што је сагласно са чињеницом да су епителне ћелије ХП богате хемосидерином (Redžić и Segal, 2004). Гранулирани ендоплазматски ретикулум се састоји из група цистерни, чије мембране могу бити континуиране са мембраном једра. У његовој околини, поред митохондрија, уочавају се бројни полирибозоми и трансфер везикуле пречника 300-350нм које потичу од самог гранулираног ендоплазматског ретикулума. Од осталих органела, у цитоплазми, у непосредној околини апикалне и базалне плазмалеме, уочавају се пиноцитозне везикуле, док се у осталим деловима могу наћи мултивезикуларна телашца и липидне капљице. Величина интрацитоплазматских везикула се увећава од базалне према луминалној, коморској површини епитела (Maxwell и Pease, 1956)

Базална мембрана епитела ХП је правилна, умерено осмиофилна структура, сачињена из три хистолошки препознатљива слоја. Испод базалних делова плазма мембрана епитела присутна је ламина рара интерна, сачињена претежно од ламинина. Непосредно испод ње налази се lamina densa, гушћи и најдебљи део базалне мембране, који је доминантно сачињен из колагена типа IV. Споља се уочава ламина рара екстерна, коју са стромалне стране додатно појачавају наставци пијалних ћелија. На супротном крају пијалне ћелије дају наставке којима облажу и спољашњу површину крвних судова строме ХП (Maxwell и Pease, 1956; Dohrmann, 1970; Serot и сар, 2001).

### *1.3.2. Строма хороидног плексуса*

Везивно ткивна строма хороидног плексуса сачињена је из разгранате, плексиформне мреже фенестрираних капилара, који су окружени растреситим везивним ткивом са фибробластима, фиброцитима и имуним ћелијама. Крвни судови хороидних вилуса су по типу капилара, изузев у пределу гломуса, где се означавају као модификоване вене и поседују већи калибар у односу на капиларе осталих делова тела који износи 15 $\mu$ m. Дијаметар пора на фенестрираним капиларима ХП износи 30-50нм. Поре су са спољашње стране прекривене базалном мембраном ендотела, што се означава као мембранска апозиција, а овакав тип пора као затворене фенестре (Strazielle и Ghersi-Egea, 2000).

Фенестрације капилара су затворене танким дијафрагмама, које дозвољавају пролаз јона, воде и малих молекула, као што су витамини и нутријенти. Ови молекули са релативном лакоћом пролазе кроз дијафрагмални филтер фенестре капилара из крвне плазме у интерстицијалну течност плексуса. Стога, у грађи и интегритету крвно-ликворне баријере доминантно учествују епителне ћелије ХП. Везивно ткивна строма ХП, која формира на ултраструктурном нивоу папилолике пројекције обложене епителом, састоји се од мреже колагених влакана, које продукују ретки фибробласти, основне супстанце са гликозаминогликанима и крвних судова који су урођени у њу (Emerich и сар, 2004, 2005). Она је обимнија у базалном делу ХП, док је у дисталном делу, у вилусима, сведена на узани слој између базалних мембрана епитела и крвних судова. Артериоле у базалном делу састоје се из истањеног ендотела око кога се уочава аморфни матрикс. У матриксу се налазе ретке глатко мишићне ћелије и ретки, неправилно разбацани снопови колагених влакана.

#### 1.3.2.1. Имуне ћелије хороидног плексуса

У хороидном плексусу присутне су бројне и разноврсне имуне ћелије, укључујући макрофаге ХП, дендритичне ћелије и Колмерове епиплексусне ћелије. Поред везивно-ткивних ћелија, већина целуларних типова која се може наћи у фиброваскуларној строми ХП припада моноцитно-макрофагној лози. Дендритичне ћелије, професионалне антиген презентујуће ћелије експримирају МНС класу II антигена, док се макрофаги мартирају позитивношћу на CD68, општи маркер хистиоцита, и CD163 антиген, маркер подтипа M2 макрофага, односно препознају се позитивном реакцијом на еквивалентне ED1 и ED2 антигене код пацова у широко примењиваном, мурином експерименталном моделу (McMenamin, 1999). Местимично, дендритичне ћелије могу да се уоче и између епителних ћелија (Serot и сар, 2000).

ХП је улазни портал за улазак имуних ћелија у ЦНС. Макрофаги и дендритичне ћелије лоциране су примарно у строми ХП, док Колмерове епиплексусне ћелије почивају на апикалној, вентрикуларној површини епитела ХП, где функционишу као локалне антиген презентујуће ћелије за лимфоците (Ransohoff и сар, 2012). Макрофаги ХП настају из мијелоидних матичних ћелија, пореклом од хематопоетске стем ћелије, које настају у феталној јетри за време екстрамедуларне хематопоезе (Prinz и сар, 2014).

Сматра се да за време интраутериног развоја ХП има важну улогу као портал којим микроглија првенствено улази у ЦСТ, а затим и мозак преко вентрикуларне површине. У мозгу хуманог ембриона, микроглија се може регистровати у непосредној близини ХП у развоју већ у петој недељи гестације (Monier и сар, 2006). Када се нађе у мозгу који се развија, микроглија регулише неколико важних процеса, укључујући регулацију броја кортикалних прогениторних ћелија и пластичност неурона (Cunningham и сар, 2013, Tremblay и сар, 2011).

На апикалној површини епитела ХП, уочавају се везане за њега Колмерове епиплексусне ћелије. Њих је први описао Kolmer (1921) и класификоване су у групу интравентрикуларних макрофага. У ту групу су још сврстане и супраепендималне ћелије, као и слободни интравентрикуларни макрофаги који плутају у ЦСТ. Супраепендималне ћелије се сусрећу у мањем броју и појединачно дистрибуиране, док се епиплексусне ћелије уочавају у групама, закачене за вентрикуларну површину хороидног епитела. Њихов облик варира од округлог преко звездастог до биполарног. Округло, овално или понекад билобулисано једро је ексцентрично постављено и унутар њега се уочава маргинализован хроматин. Колмерове ћелије величине су 13-20 $\mu$ m и изразито су светле цитоплазме, у којој су присутне бројне субплазмалемалне вакуоле, лизозоми, Голџи комплекс и цистерне гранулираног ендоплазматског ретикулума. Према најновијим схватањима, ове ћелије потичу од моноцита из циркулације. Они из крвних судова ХП доспевају у строму, а из ње, миграцијом кроз епител, у комору. Ту остају извесно време закачене за епител ХП или епендим коморе, а касније групице ових ћелија могу да се откаче од површине епендима и епитела ХП и тада од њих настају слободни, плутајући интравентрикуларни макрофаги (Sturrock, 1988; Garma-Aviña, 2004).

ЦНС се традиционално сматра имунопривилегованом средином. Састав имуних ћелија у ЦСТ здраве особе сачињен је од 90% Т лимфоцита, 5% В лимфоцита, 5% моноцита и мање од 1% дендритичних ћелија (Ransohoff и сар, 2012). Механизми регулације пасаже имуних ћелија у ЦСТ су прецизно управљани бројним интрацелуларним сигналним путевима. Инфилтришуће имуне ћелије најпре мигрирају кроз фенестриране капиларе у стромални простор. Затим се померају до базолатералне површине епитела ХП, одакле добијају пролаз кроз епител у ликвором испуњене коморе. Трансепители пролазак леукоцита у ЦСТ омогућава или олакшава експресија бројних

адхезивних молекула и хемокина на епителним ћелијама XII, укључујући интерцелуларни адхезиони молекул 1 и интерфероне (Steffen и сар 1996, Shechter и сар, 2013). Секреторни сигнални молекули присутни у ЦСТ (интерлеукин-10, интерлеукин-13, трансформишући фактор раста  $\beta$ ) затим служе као навигациони молекули који привлаче имуне ћелије на место потребе или оштећења (Shechter и сар, 2013).

#### 1.3.2.2. Популација CD68 позитивних ћелија у хороидном плексусу

CD68 је хумани макрофагни гликопротеин, који припада фамилији протеина удружених са лизозомалном мембраном. Функције овог протеина нису још увек у потпуности расветљене, али је он најпознатији маркер ткивних макрофага. CD68 могао би имати улогу у фагоцитној активности макрофага, како у интрацелуларном метаболизму лизозома, тако и у екстрацелуларним интеракцијама између ћелија или између ћелије и патогена. Он се везује за ткивно-специфичне и орган-специфичне лектине и селектине, омогућавајући макрофагима да се населе на одређеној локацији. CD68 може брзо да рециркулише између мембране ендозома, мембране лизозома и плазма ћелијске мембране, што омогућава макрофагима да се крећу клизећи преко супстрата или других ћелија које експримирају селектине (Graeber и сар, 1990, Kingham и сар, 1999).

CD68 показује високу експресију на моноцитима крви и ткивним макрофагима који настају њиховим преласком из периферне циркулације у ткива. Присутан је на мембранама Лангерхансових ћелија и, мање интензивно, на дендритичним ћелијама. Такође, експримира се и на лимфоцитима, фибробластима и ендотелним ћелијама. Туморске ћелије могу експримирати овај гликопротеин, који им омогућава да се везују за селектине васкуларног ендотела, олакшавајући дисеминацију тумора на удаљене локације (O'Mahony и сар, 2008).

У строми хороидног плексуса може се наћи неколико типова ћелија које експримирају CD68. Оне испољавају међусобну значајну фенотипску хетерогеност, а обједињено се могу означити као мождани макрофаги. Под можданим макрофагима подразумевају се макрофаги који инфилтришу мозак, а настају из моноцита циркулације, перицити, периваскуларни макрофаги и микроглија. Микроглија обухвата три различита типа ћелија: радијално разгранату микроглију, која се налази у сивој маси

ЦНС-а, лонгитудинално разгранату микроглију, која је присутна у белој маси и компактну микроглију, која се налази искључиво у деловима мозга којима недостаје крвно-мождана баријера. Између ових типова микроглије нема фундаменталне, функционалне разлике. Перицити су ћелије мезенхимног порекла које окружују капиларе и обмотане су базалном мембраном капилара. Популацију периваскуларних макрофага ћине ћелије перикапиларне локализације које се такође диферентују из моноцита периферне крви (Perry и Gordon, 1997, Guillemin и Brew, 2004).

У централном нервном систему CD68 се експримира на инфилтришућим макрофагима пореклом из моноцита периферне крви и активисаној микроглији ЦНС-а. Веома низак ниво експресије може се опазити и код квисцентне, разгранате микроглије (Graeber и сар, 1990; Slepko и Levi, 1996). Макрофаги играју круцијалну улогу у механизмима одбране домаћина, попут фагоцитозе, антигене презентације и инхибиције или неутрализације патогена или туморских ћелија. Доминантну фагоцитну популацију мозга чини микроглија, док се у физиолошким условима у ЦНС-у могу наћи само изузетно ретки инфилтришући макрофаги пореклом из моноцита. Током протекле две деценије, интензивна истраживања открила су да инфилтришући макрофаги који настају из моноцита периферне крви не припадају популацији микроглије и, да у поређењу са микроглијом, ови инфилтришући макрофаги имају већи фагоцитни капацитет, пружају бољу неуротропну потпору и имају израженија антиинфламаторна својства (Shechter и сар, 2009; Jung и Schwartz, 2012; London и сар, 2013). У менингама се могу наћи макрофаги у мекој и паучинастој можданици, субарахноидалном простору и у околини крвних судова. Поред CD68, ови макрофаги експримирају и молекуле МНС класе II, као и суперфицијални протеин CD163, макрофагни рецептор чистач. Они могу бити округлог, вретенастог или звездастог облика, а њихов број се повећава у условима инфламације пристизањем ћелија путем ХП и ЦСТ (O'Mahony и сар, 2008; Yamate и сар, 2009).

Описано је два различита подтипа периферних макрофага: инфламаторни макрофаги (M1), који су удружени са ткивном деструкцијом, и антиинфламаторни макрофаги (M2), који показују капацитет да својим фагоцитним својствима и профилом цитокинске секреције доприносе резолуцији и гашењу запаљенске реакције и тиме заустављају даље оштећење паренхима ЦНС-а и потпомажу репарацију и регенерацију (Kigerl и сар, 2009; Popovich и Longbrake, 2008). Након оштећења ЦНС-а, подтип

инфламаторних макрофага доминира над антиинфламаторним макрофагима, али се већ после неколико дана код имунокомпетентних животиња у мурином моделу успоставља равнотежа између два макрофагна фенотипа и број M1 и M2 ћелија је након 5-7 дана од настанка оштећења изједначен (Turtzo и сар, 2014).

### 1.3.2.3. Популација CD44 позитивних ћелија у хороидном плексусу

CD44 је фамилија површинских гликопротеинских рецептора ћелијске мембране, који су широко експримирани на ембрионалним и нормалним адултним ткивима. CD44 фамилија обухвата бројне протеинске изоформе које су кодирани јединственим геном, а настају алтернативним сплајсингом примарног генског транскрипта (Goodison и сар, 1999, Weber и сар, 2002). CD44 је главни ћелијски површински рецептор за хијалуронску киселину, гикозаминогликан екстрацелуларног матрикса, али има афинитет и за везивање колагена и матриксних металопроотеиназа (Cichy и сар, 2003). Више изоформи CD44 функционише у својству лиганда за остеопонтин. CD44 има функцију адхезионог молекула у међућелијским интеракцијама, као и у интеракцијама ћелија-супстрат које модулирају процесе попут ћелијске миграције током органогенезе и зарастања рана (Weber и сар, 2002, Miletti-González и сар, 2005).

Површински рецептор CD44 експримира се на многим типовима ћелија, укључујући леукоците, еритроците, фибробласте, ендотелне и епителне ћелије, као и на многим типовима туморских ћелија. У новије време утврђено је да је CD44 присутан и на хуманим макрофагима (Cichy и сар, 2003, Vivers и сар, 2002, 2004). Стимулација површинског CD44 на макрофагима везивањем бивалентног моноклоналног антитела брзо и веома изражено повећава капацитет макрофага да фагоцитије апоптотичне неутрофиле у *in vitro* условима (Vivers и сар, 2004). Остеопонтин и CD44 конститутивно су експримирани у ћелијама мозга, где је утврђено да имају проинфламаторну улогу, јер су стања аутоимуне инфламације праћена значајним повећањем њихове експресије (Kim и сар, 2004).

Сматра се да изоформе CD44 адхезионог молекула играју кључне улоге у туморској инвазији и метастазирању. На различитим нормалним и неопластичним ткивима селективно се експримирају различите CD44 сплајсинг варијанте. Објављено је само неколико студија које су се бавиле проучавањем експресије CD44 у хороидном

плексусу и то углавном у условима неопластичне болести (Varga и сар, 1996; Beschorner и сар, 2006). Проточна цитометријска анализа користила је висок ниво експресије CD44 као део имунопрофила за изолацију ефекторских и меморијских CD4+ Т лимфоцита из хомогенизованог ткива хороидног плексуса мишева и људи у студији која је испитивала промене ЦНС-специфичног имунитета на нивоу ХП које се јављају са старењем (Вагуч и сар, 2013). Варга и сарадници (Varga и сар, 1996) истраживали су имунихистохемијску експресију стандардне (Н) и две варијантне изоформе (v3, v6) CD44 молекула у серији која је обухватила 13 папилома ХП и осам карцинома ХП. У сврхе компарације експресије, у својству контроле бојењем на CD44 анализирани су и узорци нормалних ХП добијени од кадавера одраслог и педијатријског узраста. Експресија стандардне варијанте CD44Н нађена је само у испитиваним случајевима атипичних папилома и карцинома ХП, док су сви испитивани нормални хороидни плексуси били негативни на све испитиване варијанте CD44, као и папиломи ниског пролиферативног индекса. Нађено је да експресија CD44Н корелира са инфилтративним растом неоплазми пореклом од епитела ХП. Експресија варијантних облика CD44 била је позитивна само код једног од испитиваних атипичних папилома, који је експримирао и CD44Н. Као позитивна околна контрола служили су околни субependимални астроцити, чија је мембрана експримирао снажно бојење на CD44Н. CD44Н био је потпуно негативан у епителу нормалних ХП адултног и педијатријског узраста. Имунореактивност на CD44 забележена је само у глаткомишићним ћелијама и фиброхистиоцитним елементима малих артерија. Веома малобројни лимфоцити и хистиоцити присутни у строми ХП такође су експримирали CD44 (Varga и сар, 1996).

#### 1.4. Физиологија хороидног плексуса

Хороидни плексус обавља велики број разноврсних функција у ЦНС-у. Последњих деценија резултати бројних студија у великој мери и детаљно, до молекуларног нивоа, расветлили су комплексне процесе који су у основи физиологије ХП. ХП представља интегрални део крвно-ликворне баријере, секретује и пречишћава цереброспиналну течност, генерише интракранијални притисак, одржава хомеостазу јона у ЦСТ и обезбеђује микронутријенте, протеине и хормоне неопходне за неуронални и глијални развој, одржавање и функцију. На тај начин, ХП обезбеђује мозгу течну

унутрашњу средину, која има стабилан хемијски састав и која је богата хранљивим и другим материјама неопходним за његову нормалну функцију. Поремећај ових функција ХП доводи до развоја тешких неуролошких поремећаја и може узроковати фатални исход. ХП има важну улогу и у ефлуксу, односно клиренсном транспорту различитих супстанција путем активних носача смештених у базолатералној и апикалној мембрани епителних ћелија. Ова улога омогућава ХП да из ЦНС-а елиминише поједине метаболите, као што је холин, и неке лекове и друге егзогено унете супстанце (Segal, 2000; Spector, 2015).

#### *1.4.1. Секреција цереброспиналне течности*

Најпознатија и основна функција ХП је продукција ЦСТ. ХП секретује око 90% ЦСТ, и то брзином од 0,4мл ЦСТ у минути на 1г ткива. Укупна запремина ЦСТ износи 150–270мл, при чему се она комплетно замени 3-4 пута дневно код младих осраслих особа, што значи да је укупна дневна запремина секретоване ЦСТ износи око 600мл. Снабдевање ХП крвљу је 10 пута интензивније од протока крви у možданој кори, што и омогућава хороидном плексусу изузетно високу стопу секреције. Импресивној секреторној активности ХП доприноси и фенестрирана структура капилара, који пружају веома мали отпор приликом проласка малих молекула, као и постојање бројних микровила и обимних уврата на базолатералној страни епитела, што повећава поршину за контакт између епитела и интерстицијалне течности ХП на једној и ЦСТ и епитела на другој страни. Преосталих 10% ЦСТ потиче из интерстицијалне течности мозга и то из воде која се ослобађа из možданих ћелија током процеса разградње глукозе, док мањи део настаје ултрафилтрацијом кроз зидове možданих капилара . Око 25% ЦСТ налази се у шупљинама четири možдане коморе, док остатак испуњава базалне цистерне, субарахноидални простор и струји околу кичмене мождине. ЦСТ представља механичку потпору мозгу тако што смањује његову тежину за 25%, а такође делује и тако што смањује затезање у пределу нервних коренова и као механички амортизер, штитећи мозак од оштећења која могу да изазову физички потреси на лобању (Speake и сар, 2001; Redzic и Segal, 2004; Kimelberg 2004).

ЦСФ се углавном производи активном секрецијом. Покретачка сила за секрецију течности кроз једнослојни епител је активни једносмерни флукс јона са једне стране



епитела на супротну страну што доводи до стварања осмотског градијента и њему придруженог кретања воде. Кретање јона кроз целуларну мембрану је посредовано транспортерима и јонским каналима и неједнака (поларна) дистрибуција ових протеина између апикалне и базолатералне мембране је суштинска особина поларизованог епитела (Davson, 1996; Redzic и Segal, 2004). Вода доспева у ЦСТ из крвних судова у првцу осмотског градијента или преко канала као што је аквапорин (Oshio и сар, 2003). Аквапорини су група трансмембранских водених канала који су привукли значајну пажњу научника. Подтип Аквапорин 1 канала (AQP 1) присутан је на апикалној површини епитела ХП, док је AQP 4 превалентно присутан на мембранама астроцита. Инхибиција AQP 1 предложена је као терапијски метод у лечењу хидроцефалуса, али је утврђено да код AQP 1- knockout мишева, који немају овај канал на својим ћелијама, стварање ЦСТ је очувано, те се дошло до закључка да постоје и други трансмембрански механизми за транспорт воде (Kimelberg и сар, 2004; Gunnarson и сар, 2004). Епителне ћелије секретују ЦСТ тако што транспортују јоне  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$  из крви у коморе стварајући на тај начин осмотски градијент који доводи до секреције воде. ЦСТ је бистра са малим бројем ћелија и ниским садржајем протеина (Rall, 1964).

Епител хороидног плексуса поседује јединствену дистрибуцију јонских канала и транспортера, која се разликује од исте код осталих епитела. Насупрот дистрибуцији код других епителних омотача,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  котранспортер,  $\text{K}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$  канали су локализовани искључиво на апикалној, вентрикуларној страни епитела ХП (Speake и сар, 2001). На базолатералном полу локализована су два јонска размењивача:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -размењивач и бикарбонатни,  $\text{HCO}_3^-$  размењивач, док се у цитоплазми налази ензим угљена анхидраза, која катализира разградњу  $\text{H}_2\text{CO}_3$  на  $\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$ . Дисоцијација угљене киселине представља први корак у секрецији ЦСТ. И  $\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$  јони на базолатералној мембрани бивају размењени за јоне хлора и натријума, уз учешће јонских размењивача. Активношћу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азе на апикалној страни,  $2\text{K}^+$  се пумпају у, а 3  $\text{Na}^+$  из ћелије насупрот концентрацијским градијентима. Калијумски канали су такође локализовани на апикалној страни епитела и извесна количина  $\text{K}^+$  може да исцури из ћелије кроз ове канале, спречавајући на тај начин акумулацију калијума и последични оток ћелије. Укупни ефекат ових процеса је једносмерни флуks  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  од базолатералног према апикалном простору, што генерише осмотски градијент који је праћен кретањем воде. За разлику од осталих секреторних епитела кроз које се вода

креће истовремено и транс- и парацелуларно, парацелуларни пут је код епитела хороидног плексуса практично занемарљив (Speake и сар, 2001; Redzic и Segal, 2004).

ЦСТ има нешто нижу рН и концентрацију глукозе, калијума, калцијума, бикарбоната и аминокиселина од крвне плазме. Насупрот томе, концентрације натријума, хлорида и магнезијума су више у ЦСФ него исте у крвној плазми. Нивои фолата су два до три пута већи у ЦСТ него у крвној плазми, док транстиретин, протеин који се искључиво ствара у ХП представља 25% свих протеина ЦСТ. Бета-2 трансферин је десијалисана форма гвожђе везујућег протеина трансферина и може се наћи искључиво у ЦСТ, перилимфи и окуларној течности, те његово присуство у сталној воденастој секрецији из носних шупљина може бити доказ цурења ЦСТ (Redzic и Segal, 2004; Paradea и Schlosser, 2005; Damkier, 2013).

**Циркулација и реапсорпција цереброспиналне течности.** ЦСТ која се ствара у латералним можданом коморама креће се ка трећој можданој комори преко Монроових отвора. У трећој можданој комори се још новостворене течности додаје струји ЦСТ. ЦСТ затим тече кроз узани Силвијусов акведукт у четврту мождану комору. Одатле ЦСТ наставља да циркулише субарахноидалним простором, од латералних Лушкиних отвора преко понтинске цистерне према рострално дуж базе мозга, кроз Силвијусову пукотину, дуж латералне или конвексне и медијалне стране хемисфера. Кроз средњи, Мажендијев отвор и цистерну магну ликвор струји преко хемисфера малог мозга и пролази тенторијалну инцизуру, а затим се спушта наниже у субарахноидални простор који окружује кичмену мождину. Циркулација ЦСТ настаје као резултат комбинације неколико процеса. Најпре, ЦСТ потискују таласи притиска који настају пузацијама протока крви кроз артеријске крвне судове мозга, као и резултујућа експанзија мозга. Поред тога, струјање ЦСТ одржава се градијентом притиска који настаје услед континуиране продукције и ресорпције ЦСТ. Кретању ЦСТ доприносе и струје које производе киноцилије на вентрикуларној површини епителних ћелија (Emerich и сар, 2004; Brodbelt и Stoodley, 2007).

ЦСФ доспева у крв првенствено кроз арахноидалних гранулација које у ствари представљају наставак субарахноидалног простора. Ове структур описао је Raschioni још 1721. године. Арахноидални вилуси су инвагинације паучинасте мождане опне у венски сплет и присутне су у кранијалним венским синусима. Изразита дилатација субарахноидалног простора унутар вилуса формира арахноидалну гранулацију или

Пачионијево телашце. До 18. месеца код деце постоје само арахноидални вилуси, а након тога се развијају гранулације. Недавна студија која је користила снимање магнетном резонанцом демонстрирала је присуство гранулација у горњем сагиталном (54%), трансверзалном (28%) и правом синусу (18%), где су средњи дијаметри гранулација износили од 1,5 до 4,1мм (Liang и сар, 2002). Због тога што хидростатски притисак ЦСТ превазилази вредности венског притиска, арахноидални вилуси се понашају као једносмерни залисци, пропуштајући ЦСТ из субарахноидалног простора у дуралне венске синусе. При том, не постоји никаква структура у виду залистка која би механички усмеравала ток течности. Електронмикроскопски утврђено је да ћелије гранулација имају гигантске вакуоле које комуницирају и са субарахноидалним и са луменским делом ћелије истовремено и оне омогућавају трансцелуларни пут за транспорт течности који није енергетски завистан (Tripathi и Tripathi, 1974). ЦСТ се такође делимично ресорбује преко пијалних крвних судова, преко капиларних зидова и преко лимфатичних канала који се налазе непосредно уз продужетке субарахноидалног простора који окружују кранијалне и спиналне нерве. Ови путеви апсорпције могу да буду од нарочитог значаја током патолошких стања као што је хидроцефалус (Williams и сар, 1989; Davson, 1996; Brodbelt и Stoodley, 2007).

#### *1.4.2. Инфлуksна транспортна функција хороидног плексуса*

Процес размене материја на нивоу крвно-ликворне баријере ХП је прецизно контролисан и укључује бројне регулаторне механизме. Епителне ћелије ХП поседују бројне транспортерске молекуле који су локализовани и на апикалној и на базалној мембрани, те могу транспортовати инеке супстанце које не пролазе крвно-мождану баријеру. Транспортна функција ХП обухвата преношење глукозе, аминокиселина, витамина и гвожђа у мозак. Главни пут снабдевања мозга нутријентима је церебрална микроциркулација, док је транспорт преко ХП споредна рута, али изостанак њеног доприноса може резултовати неуролошким поремећајима (Emerich и сар, 2005).

**Транспорт глукозе и аминокиселина.** Однос концентрације глукозе у ЦСТ према концентрацији у плазми износи 0,6, док је однос концентрације неесенцијалних аминокиселина у ЦСТ, према концентрацији у крвној плазми 0,29-0,38; за есенцијалне аминокиселине тај однос је још нижи. Концентрација глукозе у ЦСТ је независна од

концентрације глукозе у плазми, што указује на снажан хомеостатски механизам. Сталном потрошњом ових микронутријената, мозак одржава њихове концентрације нижим у ЦСТ и интерстицијалној течности у односу на плазму. На тај начин се одржава концентрацијски градијент који омогућава неометан транспорт ових супстанци у мозак. Натријум-независни транспортер за глукозу, GLUT1, експримира се само базолатералној мембрани епитела ХП. Транспортни систем за велике, неутралне аминокиселине разгранате структуре (L-transport system) и систем за мале, неутралне аминокиселине (ASC system) имају равнотежни распоред на базолатералној, а специфичан, концентришући распоред на апикалној мембрани епителних ћелија. (Spector и Johanson, 1989; Redzic и Segal, 2004; Redzic, 2005).

**Улога хороидног плексуса у достави тироидних хормона мозгу** Тироидни хормон тироксин (Т4) се синтетише у тироидној жлезди и транспортује циркулацијом везан за албумин тироидни везујући глобулин и транстиретин (ТТР). Слободна фракција Т4 је она која пролази кроз биолошке мембране процесом слободне дифузије и нужно је да њен ниво буде виши у ЦСТ него у плазми. Синтеза ТТР од стране ХП критична је компонента у снабдевању ЦНС-а са Т4 (Schreiber и сар, 1990).

**Транспорт гвожђа.** Гвожђе се транспортује из крви у ЦСТ преко епитела ХП, уз помоћ транспортних протеина као што су феритин и трансферин, који су у ХП обилно присутни. Гвожђе се у ЦСТ транспортује везано за цитрате, аскорбате исто као и феритин. Епендим преузима гвожђе из ЦСТ и понаша се као резервоар гвожђа за мозак. Ипак, највећи део гвожђа у мозак доспева трансцитозом путем крвно-моздане баријере (Burdo и Connor, 2003).

**Транспорт витамина.** Путем ХП одвија се допремање витамина мозгу, пре свега фолата и витамина С, који у ЦСТ достижу четири пута веће концентрације него у плазми. Из ЦСТ витамини рапидно улазе у паренхим мозга преко пермеабилног епендима. Значај овог пута за транспорт витамина евидентан је код особа са мутацијама на транспортерима за фолате из ХП епитела у ЦСТ. Ови пацијенти морају да се лече масивним дозама фолата, јер развијају тешке неуролошке поремећаје (Spector and Johanson, 2014; Spector, 2015).

### *1.4.3. Ефлуksна (реанспорттивна) транспортна функција хороидног плексуса*

Последњих деценија у епителним ћелијама ХП откривена су бројни ефлуksни и инфлуksни транспортери, као и ензими који метаболишу ендогена и екзогена једињења. Ови молекули имају улоге у регулацији концентрација ендогених једињења као што су фосфати и простагландини и могу имати велики клинички значај. Ефлуks, односно стопа реансорпције за неке супстанце може бити тако висока, да нпр. спречава лек да у ЦСТ достигне своју терапијску концентрацију. Тако је данас познато да је пеницилин неефикасан за лечење бактеријског менингитиса, јер бива брзо испумпан из ЦСТ, док су лекови као цефалексин или имипенем ефикасни, јер не постоје транспортни системи који их елиминишу из ЦСТ (Spector, 2010; Spector и сар, 2015; Nigam и сар, 2015)

Ефлуksна функција ХП подразумева отклањање распадних продуката метаболизма ћелија нервног система. Системи који ово омогућују су ензимски, попут система за отклањање јодида. Преко ХП се из ЦСТ отклањају продукти метаболизма неуротрансмитера, као и леукотриен C<sub>4</sub>, који настаје као резултат имунолошких процеса, а чије би нагомилавање могло узроковати едем мозга. Како новосинтетисана ЦСТ не садржи ове супстанце, њихова концентрација у њој је увек нижа него у интерстицијалној течности, што води ка стварању дифузионе мреже којом се оне излучују из интерстицијалне течности мозга у ЦСТ. Одатле оне преко арахноидалних гранулација прелазе у венску крв и коначно – у јетру и бубреге. У овим органима се ове супстанце разграђују, а продукти њихове разградње се преко мокраће и жучи избацују из организма (Spector и Johanson, 1989).

**Уклањање ксенобиотика.** Важна улога ХП јесте заштита мозга од токсина и ксенобиотика. На епителним ћелијама ХП експримира се велики број транспортних протеина укључених у ефлуks липофилних једињења ЦСТ, као што су винка алкалоиди, етопозид, органски анјони, као што је бензилпеницилин, циметидин, аминокхипурат. Један од најзначајнијих транспортера је MDR1 Р-гликопротеин, који омогућава ефлуks ксенобиотика насупрот њиховом градијенту из ЦСТ у крв (Wijnholds и сар, 2000; Miller и сар, 2005)

**Транспорт нуклеозида.** Нуклеозидни транспортери су на поларизован начин распоређени на хороидном епителу, што је од кључне важности за клиренс ЦСТ од

нуклеозида. Пурински и пиримидински нуклеозиди преносе се помоћу  $\text{Na}^+$ -нуклеозид котранспортног система из ЦСТ у епител. ХП са једне стране учествује у уклањању аденозина који делује као неуромодулятор, а са друге стране спречава улазак циркулишућег аденозина у ЦСТ, те функционише као регулатор преноса сигнала у ЦНС-у (Redzic и сар, 2005).

ХП има и улогу у детоксикацији и заштити од штетног дејства тешких метала. Међутим, приликом обављања ове функције и он сам може да буде оштећен тешким металима као што су манган, олово и други. Висок ниво олова може довести до прекида синтезе ТТР у ХП и поремећаја преузимања тироидних хормона од страње мозга (Zheng, 1996; Redzic и Segal, 2004).

#### *1.4.4. Производња биоактивних пептида и фактора раста у хороидном плексусу*

Бројне студије показују да ткиво ХП експримира бројне рецепторе за различите хормоне који посредују хормонским дејством на локални метаболизам ХП и секрецију и састав ЦСТ (Chodobski и сар, 2001). ХП синтетише и секретује у ЦСТ неколико полипептидних молекула, укључујући и неке од фактора раста. Секретовани полипептиди могу имати двојаку улогу: могу остваривати аутокрини и паракрини ефекат, јер ћелије ХП поседују рецепторе за ове пептиде; с друге стране, ови хидросолубилни протеини и гликопротеини могу да путем ЦСТ досегну циљне ћелије у удаљеним деловима можданог ткива (Stora и сар, 2000). Неки од најзначајнијих пептида које ствара и секретује хороидни епител јесу: ТТР, вазопресин, IGF-1, IGF-2, TGF $\beta$ , TGF- $\alpha$ , трансферин, церулоплазмин, цитокини, базични фибробластни фактор раста, неуротрофични фактори глијалног порекла, неуротрофини и фактор некрозе тумора (Redžić и Segal, 2004; Emerich и сар, 2004).

**Вазопресин** је полипептид чија је концентрација вишеструко већа у ЦСТ него у плазми све је више доказа да се ствара у епителу ХП, где је детектована експресија гена за вазопресин, као и информациона РНК (Chodobski и сар, 1998). Вазопресински пептид акумулира се углавном близу апикалног пола епитела ХП, што указује да га овај епител и секретује. Он испољава аутокрини и паракрини ефекат на ХП због присуства

рецептора на хороидалном епителу и учествује у ланцу догађаја који омогућавају хормонални и неуронални утицај на контролу секреције ЦСТ (Chodobski и сар, 1998; Redžić и Segal, 2004).

**Транстиретин (ТТР)** је полипептид који је веома важан за транспорт Т4 у мозак. За ТТР везан Т4 се преко ХП транспортује у ЦСТ. У њој се део Т4 ослобађа из споја са ТТР и остаје слободан. Он једним делом бива преузет од стране ХП, преко кога се излучује из мозга. Други део слободног Т4 преузима епендим, у коме се он акумулира. Епендим се зато означава као депо Т4 за мозак. Највећи део вазопресина се синтетише у епителу ХП, док мањи део долази преко нервних влакана која потичу из паравентрикуларног једра. Секреција вазопресина у ЦСТ је под ендокрином (преко адреналина) и нервном контролом (преко нервних влакана која инервишу ХП). Вазопресин испољава аутокрини и паракрини ефекат, уз помоћ рецептора на хороидном епителу. Својом активношћу он утиче на брзину секреције ЦСТ. Концентрација вазопресина је 2 до 3 пута виша у ЦСТ у односу на плазму. Поред аутокриног и паракриног, он остварује и ендокрини ефекат. Наиме, његова концентрација опада почевши од комора ка субарахноидалном простору, тако да је концентрација у цистерна магни 2-3 пута нижа у односу на исту у ЦСТ бочних комора. То може да буде последица утрошка услед остваривања ендокриних ефеката, или због протеолизе аминокиселина епендимних ћелија, при чему настају продукти који такође имају централни ефекат (Burbach и сар, 1998).

**Инсулину слични фактори раста 1 и 2 (IGF-1 и IGF-2)** су пептиди који се понашају као потентни фактори раста и структурално су сродни инсулину. IGF-1 везује за оне рецепторе на епителу ХП, који су повезани са тирозин киназом и на тај начин учествују у регулацији раста и диференцијације хороидалног ткива. Са друге стране, IGF-2 остварује аутокрине и паракрине ефекте уз помоћ рецептора на ХП, али они нису везани за тирозин киназу. IGF-2 пронађен у нервном ткиву око комора које не експримира IGF-2 мРНА указује на дистрибуцију IGF-2 пореклом из ЦСТ кроз епендимални омотач. Својим ефектима IGF-2 повећава пластичност мозга и има значајну улогу у опоравку након повреда, поготово у раној фази, пре него што нервно ткиво не почне да производи сопствене факторе раста. Секреција у ХП расте и достиже максимум 7 дана након експериментално изазване повреде код пацова (Walter и сар, 1999; Johanson и сар, 2000).

**Трансформишући фактори раста  $\beta$**  представљају бројну групу мултифункционалних молекула, који учествују како у регулацији развоја и у опоравку мозга након повреда. Ова група укључује TGF- $\beta$ 1, који се експримира само у ХП и менингама и учествује у опоравку мозга након повреда и транзиторне исхемије и TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3, који се експримирају и у ХП и у нервном ткиву. TGF- $\beta$ 1 испољава удаљене ефекте у нервном ткиву уз помоћ тока ЦСТ и дифузијом ЦСТ у мождани паренхим, при чему учествује у регулацију хомеостазе калцијума и регулацији експресије Bcl-2 протоонкогена на оштећеним неуронима (Kriglstein и сар, 2002; Knuckey и сар, 1996).

## 1.5. Патологија хороидног плексуса

Патолошке промене у хороидном плексусу нису ретке, иако су тема само у релативно малом броју истраживања (Lun и сар, 2015). У току развоја, патологија хороидног плексуса обухвата појаву циста, хеморагија, дифузне вилусне хиперплазије и тумора. Цисте хороидног плексуса су честа појава у току феталног развоја, са инциденцом око 1-2%, али се обично спонтано повуку, не остављајући последице по развој мозга. Цисте имају већу учесталост код тризомија, посебно тризомије 18, и код неких синдрома, а изузетно су ретке када је старост мајке испод 35 година (Demasio и сар, 2002). Хеморагије у хороидном плексусу чешће се виђају код терминских, донесених новорођенчади и често су удружене са перинаталном хипоксијом/исхемијом, а могу бити узроковане траумом, антикоагулантном терапијом и конгениталним васкуларним малформацијама (Greenfield и сар, 2008, Tavani и сар, 2003). Код одојчади и деце микроорганизми, попут бактерија у неонаталном менингитису, могу користити хороидни плексус као пут примарне колонизације и ући у ЦНС путем цереброспиналне течности и вентрикуларног система (Greenfield и сар, 2008).

Хидроцефалус је стање где постоји увећање величине можданих комора са абнормалним повећањем запремине ЦСТ. Постоји неколико критеријума за поделу хидроцефалуса у више различитих класа и типова болести. Најпре се хидроцефалус може поделити на инфантилну, јувенилну и адултну форму. Даље се класификује на хидроцефалус са високим притиском и нормотензивни хидроцефалус. Постоје комуникантне и некомуникантне форме у зависности од тога да ли постоји слободан пролаз између комора и субарахноидалног простора. Коначно, хидроцефалус се може



поделити на активни, прогредирајући и заустављени хидроцефалус, у зависности од прогресије симптома. Хидроцефалус може настати услед повећања стопе секреције ЦСТ, опструкције протока на путу ликвора из комора у субарахноидални простор или због снижене или онемогућене дренаже венским системом (Oи и сар, 2011). Повећана секретија ЦСТ од стране ХП је ретка и обично је удружена са папиломом. Прекид протока ЦСТ може настати након опструкције било ког од тесних делова система кроз који протиче ЦСТ, нпр. Монроових отвора, треће коморе, Силвијевог акведукта или четврте коморе. Опструкције се најчешће дешавају након субарахноидалне хеморагије или инфекције, тј. менингитиса, услед акумулације дебрија. Блок протока у стешњеним деловима доводи до акумулације ЦСТ проксимално од места блокаде. Апсорпција ЦСТ преко арахноидалних гранулација у венски систем може бити поремећена или због конгениталних малформација у вилусима или услед неоплазме или инфламације у арахноидалним гранулацијама (Oи и сар, 2011). Лечење хидроцефалуса зависи од степена повишења интракранијалног притиска, што може бити стање које угрожава живот. Хидроцефалус се краће време може збрињавати блокирањем угљене анхидразе ацетазоламидом или блокадом К-С1 котранспортера фуросемидом. Оба ова лека снижавају интракранијални притисак тако што инхибирају секрецију ЦСТ у ХП (Роса и Sahuquillo, 2005). Дугорочни план лечења хидроцефалуса подразумева инсерцију вентрикуларног шанта или у срчану преткомору или у перитонеум.

Последице хидроцефалуса и повишеног интракранијалног притиска на хороидни плексус испитиване су углавном експериментално, на анималним моделима. У овим околностима, епителне ћелије ХП постају заравњене, нискокубичне или аплатиране, са цитоплазмом која постаје цакуолизована и дилатацијом бочних интерцелуларних простора (Madhavi и Jacob, 1995). Код људи са хроничним хидроцефалусом строма ХП постаје склеротична, а епител показује атрофичне промене. Поред тога, нађено је да ХП садржи већи број макрофага и Колмерових ћелија него у нормалним, физиолошким условима и сматра се да је ово одраз локалне инфламације и појаве детритуса у ЦСТ (Lu и сар, 1996). Међутим, неке студије су показале да су промене које се дешавају у ХП након настанка хидроцефалуса реверзибилне природе и повлаче се већ након једног дана од момента снижавања притиска и волумена путем шанта (Dohmann и сар, 1971). Повишен интракранијални притисак узрокује смањење протока крви кроз ХП. Он такође узрокује централно ослобађање вазопресина, што смањује проток крви и вероватно снижава стопу стварања ЦСТ (Fagasi и сар, 1994).

Патолошке пролиферативне лезије хороидног плексуса могу да се манифестују као вилусна хиперплазија, бенигни папиломи или малигни тумори, односно карциноми. Дифузна вилусна хиперплазија и тумори ХП могу довести до хидроцефауса услед прекомерне продукције ЦСТ, што се може лечити каутеризацијом или ресекцијом (Smith и сар, 2007). Иако тумори ХП представљају мање од 1% свих неоплазми мозга, они чине 2-4% тумора код деце, а чак 10-20% тумора у првој години живота (Naeini и сар, 2009). Карциноми ХП углавном се срећу у бочним можданим коморама код деце, док су у адултном добу најчешћи папиломи четврте мождане коморе. Папиломи и карциноми ХП удружени су са комплексним и разноврсним цитогенетским абнормалностима и геномским алтерацијама, што указује на различите патогенетске путеве у настанку бенигну и малигну лезија ХП (Tong и сар, 2015).

Папиломи ХП су бенигни папиларни тумори (неоплазме WHO градус I), који личе на нормални ХП, али су ћелије епитела гушће паковане и елонгиране. Ћелије формирају тесне везе, поседују микровиле, цилије и базалну мембрану и често показују акумулацију гранула гликогена у цитоплазми. Папиломи не инвадирају паренхим мозга и, за разлику од карцинома, не развијају некрозу. Карциноми хороидног плексуса су инвазивни тумори и могу бити солидне грађе, хеморагични или некротични. Углавном су лоцирани у бочним или четвртој можданој комори. Дијагноза малигног тумора, односно карцинома ХП (неоплазме WHO градус III) заснива се на микроморфолошким променама: неопластичне ћелије показују повећан број митотских фигура, нуклеарни плеоморфизам и поља некрозе. Карцином ХП су тумори који брзо расту, а петогодишња стопа преживљавања је око 40%. Тумор се шири путем цереброспиналне течности на друге делове ЦНС-а, док је појава системских метастаза, пре свега у јетри и плућима, забележена код пацијената са дужим преживљавањем (Ironside и сар, 2002). Лечење ових тумора заснива се на комплетној хируршкој ресекцији неопластичног ткива. Често се примењују и адјувантна хемотерапија или радиотерапија (Wrede и сар, 2007).

У ХП могу се развити и менингеоми, липоми, ксантогрануломи, док се изузетно ретко могу срести метастазе. Иако менингеоми, тумори менинготелијалних ћелија арахноидалне мождане опне, обично настају на површини мозга, могу настати и из ХП, вероватно из теле хороиде, где су менингеалне ћелије непосредно уз вентрикуларни епител (Lun и сар, 2015). Инциденца метастаза у ХП је веома ниска, износи око 0,14% свих можданих метастаза. Примарно порекло тумора који метастазирају у ХП је

најчешће реноцелуларни карцином бубрега и карцином плућа, али су описане и метастазе тумора дојке, желуца и дебелог црева (Kohn и сар, 1996).

Све већи број студија указује на укљученост патолошких промена ХП у развој когнитивних и неуродегенеративних поремећаја. За разлику од крви где постоји три главна носача-транспортера за тироидне хормоне, у ЦНС-у ту функцију обавља само један протеин који се ствара у ХП – транстиретин. У скаду са тим, дефицит тироидних хормона у ЦНС-у, који је повезан са абнормалним развојем мозга, адултном деменцијом, депресијом и другим когнитивним поремећајима, може бити последица системског хипотироидизма или дефеката транстиретина хороидног плексуса (Davis, 2007). Хороидни пексус је центар најмање три различита механизма за уклањање амилоид- $\beta$  пептида, који су укључени у настанак Алцхајмерове болести: клиренс амилоида- $\beta$  преко ЦСТ, директна апсорпција амилоида- $\beta$  и стварање шаперонских протеина и протеаза за амилоид- $\beta$ . У Алцхајмеровој болести долази до убрзане атрофије ХП, што извесно води до смањења клиренса амилоида- $\beta$  преко ова три механизма (Fleming и сар, 2009, Serot и сар, 2003). Зато је постављена хипотеза да су атрофичне промене ХП узрочно повезане са Алцхајмеровом болешћу (Maurizi и сар, 2010, Silverberg и сар, 2003). Убрзана атрофија ХП среће се и у другим обољењима ЦНС-а као што су мождани удар и шизофренија (Serot и сар, 2003).

Алцхајмерова болест је неуродегенеративно обољење које је често фатално у оквиру неколико година након постављања дијагнозе. Инциденца Алцхајмерове болести повећава се са старењем и најчешћа форма болести је она са касним почетком, која се јавља код старијих од 65 година. Алцхајмерова болест презентује се са два типа лезија: екстрацелуларни амилоидни плакови и интрацелуларна неурофибриларна агрегација (Duyskaerts и сар, 2009). Амилоидни плакови састоје се од екстрацелуларних депозита амилоид- $\beta$  пептидних фибрила. Амилоид- $\beta$  генерално се сматра отпадним продуктом метаболизма који остварује позитивно дејство на нивоу можданих синапси у пикомоларним концентрацијама (Puzzo и сар, 2008). Интрацелуларна неурофибриларна влакнаста клубад сачињена су од абнормално фосфорилисаног тау, протеина удруженог са микротубулима (Duyskaerts и сар, 2009). Сматра се да акумулација тау протеина оставља тешке последице по функцију неурона, а густина ових акумулација корелира са тежином симптома. Амилоид- $\beta$  и тау су нормално присутни у ЦСТ и дренажа ликвора сматра се главним путем елиминације амилоида- $\beta$  из ЦНС-а (Tanzi и сар, 2004). У

Алцхајмеровој болести касног почетка концентрација амилоида- $\beta$  у ЦСТ је снижена, али је концентрација тау протеина повишена и вероватно одражава неурално оштећење. Ове промене се могу мерити у ЦСТ пре почетка било којих других симптома, те се могу користити као дијагностички биомаркери болести (Jack и сар, 2010).

## 1.6. Хороидни плексус као део неуроимуног система

Систем баријера који одваја ЦНС у имунолошки привилеговани компартман укључује крвно-мождану баријеру, коју формира ендотел повезан тесним међућелијским везама, а који окружује микроваскулатуру паренхима, и крвно-ликворну баријеру, чији је интегрални део ХП. Поред класичних улога ХП у секрецији цереброспиналне течности, чиме мозгу обезбеђује нутритивни метаболички миље и формира механичку заштиту и одржавања мождане хомеостазе, последњих деценија откривено је да је ХП интегрални део неуроимунолошког система (Johanson и сар, 2011; Baruch и Schwartz, 2013). Стратешка позиција ХП између крви и цереброспиналне течности чини га идеалним неуроимунолошким посредником, који је стално изложен сигналима који долазе из паренхима ЦНС-а и циркулације. У складу са тим, судбина ХП као активног поља интеракције има утицаја на пластичност здравог мозга са једне стране, и, са друге стране, игра вежне улоге у старењу и неуродегенеративним стањима, када је функција ХП дерегулисана (Baruch и Schwartz, 2013; Baruch, 2013).

Сазнање да ЦНС представља имунопривилеговану средину у којој у физиолошким условима не би требало да буде имуних ћелија базирано је на фундаменалним запажањима из прве половине XX века. Тада су истраживачи описали да ткивни графтови пресађени у око или мозак опстају дуже него они који се имплантирају у друге делове тела (Shirai, 1921; Medawar, 1948). Ово сазнање је касније поткрепљено све већом количином експерименталних доказа који су указивали на просторну и имунолошку одвојеност ЦНС-а од циркулишућег имунитета. Утврђено је да ЦНС у просторном смислу предствља затворени одељак, сепарисан од циркулације физичким баријерама. Поред тога, став да је ЦНС имунолошки аутономна јединица, која идеално функционише у одсуству имуног надзора, потпомогнут је и открићем да ЦНС има сопствену популацију фагоцитних ћелија – микроглију, која стално настањује ЦНС. Дакле, кад год се имуна ћелија нађе у периваскуларном простору ЦНС-а,

церебрспиналној течности или у самом паренхиму, то се сматра знаком аутоимуне болести или, у најмању руку, знаком зачетка такве болести. У складу са тим, присуство ћелија стеченог имунитета у ЦНС-у је много пута описивано као главни кривац за развој аутоимуног енцефаломијелитиса (ЕАЕ), муриног модела мултиплексклерозе, где је доказано да ове ћелије директно нападају мијелин у ЦНС-у, водећи до неуродегенерације (Sospedra и Martin, 2005; Schwartz и Baruch 2014).

Неколико популација имуних ћелија укључено је у развој аутоимуних патолошких поремећаја ЦНС-а, међу којима су ЦНС-специфични Т лимфоцити, који укључују и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> подтипове, и макрофаги настали из моноцита периферне крви. Током последњих деценија, широко прихваћено гледиште да имуне ћелије стеченог имунитета представљају искључиво негативне актере имуног одговора фундаментално се променило. Данас је познато да ЦНС константно надзиру циркулишуће имуне ћелије присутне у церебрспиналној течности, али не и у паренхиму, и да у физиолошким условима активисане Т ћелије патролирају ЦНС-ом, без икакве удружености са аутоимуном болешћу (Engelhardt и Ransohoff, 2005; Kunis и сар, 2013). Поред тога, ЦНС-специфични Т лимфоцити доприносе пластичности мозга, како у здрављу, тако и у болести, у одговору ЦНС-а на трауму (Kirnis и сар, 2012). Ипак, из чињенице да се у условима хомеостазе у паренхиму мозга могу наћи само изузетно ретке циркулишуће имуне ћелије произилази неколико кључних питања која се тичу локације одакле ЦНС-специфичне Т ћелије долазе у здрав мозак.

Након оштећења ЦНС-а, када трауматизовани паренхим отпушта проинфламаторне медијаторе, ХП брзо реагује и повећава експресију широког спектра адхезионих молекула и хемокина који су неопходни за промет леукоцита (Shechter и сар, 2013; Szymdynger-Chodobska и сар, 2012). Ова локална активација корелира са проласком макрофага који настају из моноцита крви и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у ЦНС и корисне репарације оштећеног паренхима. Поред оркестрације транспорта имуних ћелија у ЦНС, ХП реагује и на трауму ЦНС-а тако што секретује у ЦСТ различите неуротропне факторе, као што су инсулинима слични фактори раста, који су неопходни за опстанак неурона и неурогенезу (D'Ercole и сар, 2002; Ghabriel и сар, 2010; Madathil и сар, 2010;)

Пошто је стално изложен церебрспиналној течности, ХП експримира рецепторе за разне сигнале опасности који настају у паренхиму, што хороидном плексусу даје

способност да осети, региструје и осговори на потребе ЦНС-а. За ову функцију су од највећег непосредног значаја Toll-like рецептори (TLR). Интрацеребровентрикуларно убризгавање агониста на рецепторне TLR-7 or TLR-9 изазива проинфламаторни одговор епитела ХП, чиме је потврђен ефекат ових супстанција из ЦСТ на ХП (Butchi и сар, 2011). Поред тога, након акутног оштећења ЦНС-а, настанком лезије на кичменој мождини, пролазак излечујућих, алтернативно активисаних, антиинфламаторних М2 макрофага који су неопходни за репарацију оштећења одвија се управо кроз ХП, иако је он веома просторно удаљен од места насталог оштећења (Shechter и сар, 2013). Слично томе, сигнали који настају у можданом паренхиму у условима менталног стреса такође изазивају одговор ХП, који бива праћен прометом Т лимфоцита кроз ХП у ЦСТ (Lewitus и сар, 2008).

ХП је константно изложен сигнаlima из циркулације. Као модел за акутну, односно хроничну периферну инфламацију, Маркес и колеге користили су интраперитонеално убризгавање липополисахарида (ЛПС). Утврђено је да на ово ХП промтно реагује променама у свом транскриптому. У одговору на ЛПС запажена је снажна и пролазна усходна регулација гена повезаних са метаболизмом гвожђа, што је било у корелацији са повишеним нивоом про-хепцидина у ЦСТ, који се користи као маркер метаболизма гвожђа (Marques и сар, 2009а, 2009б, 2009с). Ови резултати указују на промене функција ХП у регулацији хомеостазе гвожђа у мозгу, као одговор на периферне стимулусе.

Одговор ХП на периферне стимулусе, који се региструју преко сигнала из циркулишуће крви, није ограничен само на инфламаторна стања. ХП непрекидно контролише састав ЦСТ регулацијом промета и уласка супстанција из серума у ЦСТ преко епителног слоја. Инсулину сличан фактор раста 1 (IGF-1), моћан неуропротективни фактор који утиче на пластичност мозга, улази из циркулишуће крви у мозак најпре се везујући за рецептор на мембрани епителних ћелија ХП, који интерагује са другим мембранским протеином, мегалином, чиме се омогући транспорт IGF-1 у мозак (Llorens-Martin и сар, 2009; Carro и сар, 2005). Исти овај транспортни протеин мегалин посредује у транспорту лептина из серума у ЦСТ преко ХП, што додатно потврђује значај ове транспортне осе за функцију мозга, јер концентрације лептина могу да утичу на хипокампаљну синаптичку пластичност и когнитивне функције (Harvey и сар, 2005 и 2006; Dietrich и сар, 2008).

### *1.6.1. Хороидни плексус - селективно активна капија за леукоците*

У физиолошким условима, у паренхиму ЦНС-а присутан је веома мали, ограничен број имуних ћелија, а њихова инфилтрација у ЦНС када дође до оштећења је стриктно регулисана. У условима болести ЦНС-а, уско дефинисана и пажљиво регулисана популација имуних ћелија испољава своје корисне ефекте тако што контролише неуроинфламацију. Хороидни плексус у овим процесима заузима централно место као главни пут транспорта, селективно активна капија за леукоците и место интеракције системског имунитета и ЦНС-а.

Структурно, крвно-ликворна баријера базира се на тесним међућелијским везама између епителних ћелија ХП, док тесне ендотелне везе или астроцитна глија лимитанс недостаје (Redzic, 2011). Дакле, ХП се одликује релативном структурном пермеабилношћу за пролазак имуних ћелија. Поред тога, ћелијски састав вентрикуларне и кичмене СЦТ разликује се битно од крви, а у њему доминирају CD4<sup>+</sup> меморијске Т ћелије (Kivisakk и сар, 2003; Provencio и сар, 2005). Ова сазнања довела су до научне претпоставке да Т ћелије улазе у ЦСТ преко ХП на строго регулисан начин.

За разлику од крвно-мождане баријере, ХП конститутивно експримира адхезионе молекуле и хемокине, што подржава тезу о транепителном промету леукоцита (Kunis и сар, 2013; Shechter и сар, 2013b). ХП селективно експримира интегринске рецепторе, као што је интрацелуларни интегрински рецептор 1 (ICAM-1) на апикалној површини епитела, што се сматра упориштем за трансепителну миграцију леукоцита кроз ХП у правцу од базалног до апикалног пола епителних ћелија (Kunis и сар, 2013). Промет леукоцита кроз ХП и путем ЦСТ потврђен је експерименталним налазима да трансферисани Т ћелијски бласти могу да се нађу у ХП. У условима паренхимског оштећења, неутрофилни гранулоцити, моноцити и Т лимфоцити улазе у оштећени ЦНС преко ХП (Carrithers и сар, 2002; Szmydynger-Chodobska и сар, 2012; Kunis и сар, 2013; Shechter и сар, 2013b).

Занимљиво да је овај пут предложен и као могуће место уласка енцефалитогених ћелија, односно ефекторских Т лимфоцита, аутореактивних на мијелин, који учествују у патогенези аутоимуног енцефалитиса. Ове ћелије улазе у ЦНС путем CCL20-CCR6 интеракција између Th17 ћелија и CCL20 који се ствара у самом ХП (Ransohoff, 2009; Reboldi и сар, 2009). Међутим, пошто се CCR6 такође експримира и на другим ћелијским

популацијама, укључујући регулаторне Т ћелије, CCL20 би могао да учествује и у олакшавању имуног надзора у ЦНС-у у условима без патолошких поремећаја. Енцефалитогене Т ћелије, које стварају интерлеукин 17 или фактор стимулације гранулоцитно-моноцитне лозе (GM-CSF), у веома малом броју присутне су у строми ХП здравог миша. Када се епителне ћелије ХП изложе дејству ових цитокина, не долази до повећања експресије адхезионих молекула и других фактора који учествују у промету транспорту имуних ћелија (Kunis и сар, 2013).

### **Регрутација макрофага из циркулације преко хороидног плексуса и ЦСТ.**

Данас је познато да ХП представља селективну капију која омогућава улазак моноцита у ЦНС, а приликом тог транзита ХП учествује и у њиховој едукацији. Експериментална студија на мурином моделу, показала је да макрофаги пореклом из моноцита периферне крви не долазе на место оштећења кичмене мождине кроз оштећену крвно-мождану баријеру. Чињеница да се макрофаги настали из моноцита крви појављују на месту лезије паренхима ЦНС-а релативно касно, указала је на могућност да се улазак моноцита одвија на неком удаљеном улазном месту. Испитивањем потенцијалних путева транспорта моноцита у ЦНС, откривено је да моноцити локално постају ћелије које разрешавају инфламацију пролазећи кроз ХП на свом путу до места оштећења (Shechter и сар, 2009, 2013). Утврђено је да овај пут зависи од оштећењем изазване експресије неколико молекула који учествују у транспорту у ХП, посебно интегрина VCAM-1, кога експримирају ендотелне ћелије васкулатуре ХП, као и ензима CD73, кога експримирају епителне ћелије. Блокирање ових приземљујућих молекула инхибира усмеравање М2 макрофага у оштећени паренхим и резултује лошијим опоравком након оштећења. Поред тога, механичка блокада протока ЦСТ применом полимеризујућег агенса доводи до сличног опажања редуковане миграције М2 макрофага до места лезије након оштећења кичмене мождине (Shechter и сар, 2013b).

Чињеница да леукоцити прелазе далеки пут од ХП, удаљене вентрикуларне капије, до места оштећења у кичменој мождини, указује на то да такав начин уласка леукоцита у ЦНС има улогу у осигуравању да се њихов ћелијски капацитет помери ка анти-инфламаторном фенотипу. Састав ЦСТ је углавном имуносупресивних својстава, јер у њему доминирају цитокини као што су IL-13 и TGF- $\beta$ 2. Имуносупресивна средина је карактеристика многих имунопривилегованих средина, као што су тестис или око. Познато је да овај течни миље утиче на усмеравање моноцита према М2 фенотипу, тј.



ћелијама које разрешавају запаљење. Стога продужена рута миграције од ХП, тј, места венрикуларног уласка у ЦСТ до лезије у кичменој моздини служи у едукативне сврхе и осигурава да се макрофаги настали из моноцита крви, а који се накупљају у подручју оштећења кичмене моздине, одреде у правцу разрешења инфламације још пре него што стигну на место запаљења (Shechter и сар, 2013b, 2013a).

**IFN- $\gamma$ -зависна активација хороидног плексуса.** Применом анализе репертоара Т ћелијског рецептора (TCR) недавно је доказано да су у строми ХП присутне CD4<sup>+</sup> Т ћелије специфичне за ЦНС антигене (Varuch и сар, 2013). Ове ћелије експримирају маркере ефекторских меморијских ћелија и продукују IL-4 и интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), указујући на константно присуство Th1 и Th2 ћелија у имунолошки наивном ХП. *In vitro* студије одговора ХП на ове ефекторске цитокине, заједничком култивацијом мишићних примарних епителних ћелија ХП са различитим цитокинима, откриле су да IFN- $\gamma$  игра кључну улогу у активацији ХП да омогући транспорт леукоцита. *In vivo* студије су показале да мишевима са химеричном костном сржи недостаје рецептор за интерферон гама (IFN- $\gamma$ R) само у ЦНС-у, или им недостаје експресија IFN- $\gamma$  искључиво у циркулишућим имуним ћелијама, као и код IFN- $\gamma$ R knockout трансгеног миша. Код свих ових генетски модификованих експерименталних животиња присутни су дефекти у активацији ХП за пропуштање и миграцију леукоцита (Kunis и сар, 2013). Стога, ови резултати указују на то да под физиолошким условима сигнализација IFN- $\gamma$ /IFN- $\gamma$ R од стране циркулишућих ћелија и епителних ћелија ХП је кључна за леукоцитни имунолошки надзор ЦНС-а. Поред тога, ова IFN- $\gamma$  зависна активација ХП од значаја је и у контексту оштећења ЦНС-а. Након оштећења кичмене моздине, код IFN- $\gamma$ R knockout трансгеног миша смањена је инфилтрација места лезије у кичменој моздини и ЦСТ и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима и моноцитима, у поређењу са озлеђеним нетрансгеним мишем, са штетним ефектима на процес опоравка (Kunis и сар, 2013).

### 1.6.2. Неуроимунологија хороидног плексуса и старење

Хороидни плексус је компартман који је од кључног значаја за целоживотно одржавање ЦНС-а, те се промене које се у ХП јављају са старењем реперкутују на морфофункционално стање ЦНС-а. ХП, активно поље интеракције између циркулације и ЦНС-а, насељено је ЦНС-специфичним ефекторским CD4<sup>+</sup> Т меморијским ћелијама.

Са старењем, специфичност Т лимфоцита за антигене ЦНС-а остаје очувана, иако се равнотежа цитокинско-хемокинске секреције мења у правцу Th2 епителне инфламације, са штетним последицама по функцију мозга (Вагуч и сар, 2013). Дакле, под физиолошким условима, и са старењем у ХП остаје очуван широк репертоар ЦНС-специфичних CD4+ Т ћелијских клонова. Они након препознавања и реактивације својим познатим антигенима, а који им бивају презентовани путем дендритичних ћелија у хороидном плексусу, или улазе у ЦСТ, или се задржавају у ХП (McMenamin, 1999; Bartholomäus и сар, 2009).

Једна од најпроминентнијих карактеристика старења је померање имунолошке равнотеже ка доминацији Th2-везаног одговора. У складу са тим, у муриним моделима старења забележена је са годинама удружена дисрегулација у стварању цитокина. То се пре свега односи на пад продукције IFN- $\gamma$  и повећано стварање IL-4 (Shearer, 1997; Whalley и сар, 2004). Испитивањем локалне равнотеже ефекторских цитокина на нивоу ХП, откривено је да постоји постепени пораст међусобног односа IL-4: IFN- $\gamma$  током старења. Пораст овог односа цитокина може представљати одраз генералног стања имуног система у старењу, што доприноси схватању да је имуни одговор у ХП интегрални део системског имунитета. Занимљиво је да стимулација ХП миша имунизацијом антигенима ЦНС-а доводи до обогаћења Т ћелијских рецептора (TCR) који су специфични за ЦНС, на CD4+ Т лимфоцитима који насељавају ХП. Имунизација овалбумином није узроковала овакву промену на Т ћелијама ХП (Вагуч и сар, 2013).

Старење ХП и имуног система узрокује опадање когнитивних способности путем дисрегулације комуникације између ЦНС-специфичних Т лимфоцита који насељавају ХП и епителних ћелија ХП. Ова дисрегулација узрокује губитак равнотеже у цитокинској секрецији, са повећањем нивоа IL-4, који стимулише епителне ћелије ХП да стварају хемокин CCL11, који пак негативно утиче на функционалну пластичност мозга и доводи до когнитивног пада (Вагуч и сар, 2013). Занимљиво је да описаним механизмима старосних промена у ХП су веома слични они који се одвијају у плућном епителу код пацијената који болују од астме. Наиме, у плућном епителу астматичара се дешава дисрегулација са померањем инфламације у правцу Th2 одговора, која у механистичком и функционалном погледу одговара променама у ХП удруженим са старењем (Cockcroft и Davis, 2006).

Недавно објављена студија показала је да је старење удружено са прекомерном активношћу интерферон типа I система (IFN-I) на нивоу хороидног плексуса. Истраживачи су пронашли корелацију прекомерне експресије интерферона типа I (IFN-I) у хороидном плексусу миша и човека и старења, анализирајући постмортем пресеке мозга особа преминулих од узрока неvezаних за ЦНС. Ова прекомерна експресија се јављала са старењем и покренута је сигнаlima из možданог ткива, а који су присутни у цереброспиналној течности (Ваgуч и сар, 2014).

Ваgуч и колеге су такође показали да третман епителних ћелија ХП интерфероном бета (IFN- $\beta$ ), кључним представником IFN-I фамилије цитокина, супримира експресију инсулину сличног фактора раста (IGF1) и možаног неуротрофичног фактора (BDNF - brain derived neurotrophic factor), молекула који су од есенцијалног значаја за раст и преживљавање неурона. Убриzавање неутрализујућих антитела на IFN-I рецептор ( $\alpha$ -IFNAR) опонира сигнализацију интерферон типа I молекуларног пута у мозгу, што омогућава да се опет успоставе оштећене когнитивне функције код миша. Ово је праћено појачаном хипокампаљном неурогенезом и експресијом антиинфламаторног цитокина интерлеукина-10, и смањењем астроглиозе и микроглиозе. Стога, поред важног закључка да се у старењу повећава IFN-I одговор, ова студија указује на то да неутрализација типа I интерферонског одговора у ЦНС-у може представљати нови терапијски приступ у контроли и превенцији опадања когнитивних функција, која је удружена са старењем (Ваgуч и сар, 2014).

## 1.7. Старење

Упркос великом напретку молекуларне биологије и генетике, контрола дужине људког века и етиопатогенетски механизми феномена старења још увек нису у потпуности разјашњени (Јин и сар, 2010). Развој ефикасних метода лечења за многе, посебно инфективних и хроничних, масивних незаразних болести, измењен начин живота и хигијенско-дијететске навике код великог дела популације, омогућили су да све више људи умире услед старости. Напредак медицине значајно је продужио животни век, што је узроковало повећање удела старих у светској, али и већини националних популација (Weinert и сар, 2003). Данашња просечна очекивана старост људског организма је 85 година, а за само 2000 година дужина живота је више него удвостручена

(Harman и сар, 2001). Неумитно пропадање организма, које одређује коначни век трајања живота, старење и са њим повезани поремећаји хомеостазе и повећана инциденца патолошких стања, проблем су који добијају све више пажње научне заједнице (Chinta и сар, 2015).

Са старењем, у организму долази до физиолошких, функционалних и структурних промена које га разликују од младог, адултног организма. Једна од основних карактеристика старења јесте раст морталитета експоненцијално са годинама, по достизању зрелости. То је последица опадања физиолошког капацитета, смањењења способности одржавања хомеостазе, нарочито способности адаптације на стрес, и веће подложности и осетљивости на болести. Осим тога, долази до промене биохемијског састава ткива: накупљање липофусцина, унакрсно повезивање протеина екстрацелуларног матрикса, оксидација протеина, промењен ниво генске експресије и друго (Beck и сар, 2002). Током живота нормално већ после тридесете године долази до постепеног и прогресивног опадања нормалних физиолошких функција, укључујући и лако мерљиве параметре као што су мишићна снага, срчана резерва, брзина спровођења импулса у нервима, плућни капацитети, гломеруларна филтрација, васкуларни еластичитет и друго. О болестима које су последица тих промена, акумулираних током година, говоримо као о болестима старе доби или клиничко-патолошким карактеристикама старења. Ту спадају: старосне промене на кожи, старење зглобова и костију, ослабљен имунитет, мрка атрофија, промене на кардиоваскуларном систему, већа подложност малигним болестима и промене на постмитотским (перманентним, пострепликативним) ћелијама, које временом постепено губе функцију и услед акумулације штетних продуката метаболизма које није могуће уклонити (липофусцински пигмент у неуронима, кардиомиоцитима, хепатоцитима) (Underwood и сар, 2004).

Већина дефиниција старења има биолошки фокус и описује постепено опадање ћелијске репликације и смањење функције, а у основи је пораст „нереда“ на молекуларном нивоу (Hauflick и сар, 1998). Многобројне дефиниције старења могу се поделити на стохастичке и нестохастичке. Стохастичке истичу појаву катастрофалне грешке у контролним механизмима, које се дешавају насумично и објашњавају процес старења случајним догађајима, тј. епигенетским и генетским изменама регулаторних секвенци и механизма генома, где се старење јавља као последица акумулирања ових

промена. Нестохастичке (механистичке, развојно-програмске) подразумевају биолошке промене које су ендogene, суштинске за људски организам и унапред генетски програмиране. Највећи број од преко две стотине теорија старења управо припада овој групи. Оне покушавају да одговоре на питање који су биолошки процеси одговорни за старење. Њихов значај се може проценити емпиријски, али и на основу броја фенотипских карактеристика које објашњавају. Тако, нпр. Хауфлицкова теорија о губитку митотског потенцијала не објашњава старење у пострепродуктивним ткивима као што је мозак (Schofield и сар, 1999; Jin и сар, 2010, Chinta и сар, 2015).

Данас је прихваћен став да је старење изразито комплексан, мултифакторијалан процес, који се фенотипски испољава генерализованим и прогресивним соматским пропадања у функцији времена, опадањем физиолошких функција и већом подложношћу болестима и стресу. Теорије старења посматрају тај процес са различитих аспеката: генетског, биохемијског и физиолошког стања људског организма, као и начин на који се те карактеристике мењају током старења. еволутивне теорије посматрају старост кроз смањење репродуктивних могућности, пропадање у зависности од квалитета околине и фенотипске промене. Генетске теорије се баве хипотезама које обухватају идентификацију гена старења, акумулацију грешака у генетском апарату, програмирано старење и теломере. Биохемијске теорије се баве енергетским метаболизмом, стварањем слободних радикала, брзином старења и стањем митохондрија. Физиолошке теорије баве се углавном ендокриним системом и улогом хормона у регулацији брзине старења ћелија (Kowald и Kirkwood, 1996; Flatt и сар, 2009; Yin и сар, 2014).

### *1.7.1. Теорије старења*

Бројне теорије су предложене да би се објаснио процес старења, али ни једна од њих није у потпуности задовољавајућа и често се међусобно преклапају. Модерне биолошке теорије старења могу се грубо сврстати у две категорије: програмске теорије и теорије оштећења или грешке (стохастичке). Програмске теорије сматрају да се старење одвија према биолошкој табlici, програму који вероватно регулише и детињство и одрасло доба. Ова регулација зависи од промена у експресији гена које погађају системе одговорне за одржавање, репарацију и одбрамбене одговоре. Теорије оштећења или

грешке наглашавају дејство и утицаје средине на живи организам, које кумулативно индукују оштећења на различитим нивоима која доводе до старења (Davidović и сар, 2010; Jin и сар, 2010).

*Програмске теорије старења обухватају следеће:*

**Теорија програмиране дуговечности.** Према овим теоријама, старење је резултат секвенционираних искључивања одређених гена, што узрокује дефиците који се дефинишу као старосне промене (Davidović и сар, 2010). Овде спаде и теорија о теломерама, према којој је животни век јединке дефинисан још на зачећу. Добијена комбинације гена наслеђених од мајке и оца програмира митотску способност ћелија. Због тога се сматра да ће сада, са завршетком мапирања људског генома, бити могуће открити који су то гени одговорни за дуговечност. Експерименти на нижим организмима као што винска мушица, нематода *C. Elegans* и други, показали су да заиста постоје гени чије присуство повећава критични број деоба једне ћелије. Ген сличан гену *LAG-1* (longevity assurance gene) квасца, који кодира један протеин мембране и на још непознат начин повећава број деоба за око 30%, нађен је и у људском геному. Смрт сваке ћелије, према овој теорији, је програмирана – она умире након одређеног броја деоба, што у случају хуманог фибробласта, на пример, износи педесетак деоба (Weismann-Swim-Nayflick-ов лимит).

Теломере су понављајуће секвенце ДНК на крајевима хромозома, које их штите од деградације. Преостали животни век једне ћелије је сразмеран дужини теломера које се са сваком деобом скраћују. Неке репродуктивне ћелије и канцерске ћелије се могу делити бесконачно много пута захваљујући теломерази која стално додаје нуклеотиде и тако надокнађује изгубљени део теломера. Већина нормалних ћелија не синтетише овај ензим, али је присутан код многих типова туморских ћелија, као и у матичним ћелијама. На путу кроз диференцијацију, ген за теломеразу бива утишан, тако да се ензим више не синтетише и долази до скраћивања теломера. Регулисањем експресије гена за теломеразу би се, према томе, могли лечити тумори, или продужити живот. Међутим, комплексност целог процеса не дозвољава једноставну транслацију резултата ин витро на жив организам. Такође, претпостављало се да је искључивањем гена за теломеразу могуће спречити појаву тумора. Међутим код експеримената на животињама инциденца малигнитета је чак повећана. Недостатак теломеразе, у комбинацији са мутираним

тумор- супресорним геном *p53* доводи до хромозомске нестабилности (Vodnar и сар, 1998; Buseman и сар, 2012)

**Ендокрина теорија старења.** Биолошки сат одвија се тако што хормони контролишу ритам старења. Ендокрини систем је одговоран за регулацију репродуктивног циклуса, раста, енергетског метаболизма, депоновање и ослобађање хранљивих материја и реакцију на стресну драж ((Dilman и сар, 1986). Старење настаје као последица опадања пластичности ендокриног система и исцрпљења стварања хормона. Посредством инсулин/ IGF-1 сигналног пута регулише се транскрипција фактора DAF-16/FOXO који укључује гене одговорне за отпорност на стрес, поправку ДНК, урођени имунитет, стресни одговор, чиме се животни век може и удвостручити. Овај еволуционо конзервиран пут хормонске регулације сматра се потенцијалним механизмом у основи старења (Antebi и сар, 2005; van Heemst, 2010)

**Имунолошка теорија старења.** Имуни систем је програмиран да се временом гаси, што доводи до повећања осетљивости на инфективне болести и већег ризика са погрешним реаговањем, односно развојем аутоимуних поремећаја. Са годинама опада активност Т-ћелијског имунитета и мења се профил цитокинске експресије Имунолошка теорија је уско повезана са ендокрином, јер промене хормонског статуса утичу на имунолошке снаге организма. Са годинама, смањује се способност организма да се избори са запаљењем, слабе одговарајући ензимски системи, а уједно се повећава ниво проинфламаторних супстанци. Претпоставља се да је то последица стреса и сталне изложености антигенима (Effros и сар, 2008; Franceschi и сар, 2000).

*Теорије оштећења или грешке укључују:*

**Теорија трошења (Wear and tear theory).** Организам је током живота изложен многобројним факторима и ситуацијама које узрокују свакодневне мање повреде и трошење ћелија и ткива, што резултује смањењем њихове виталности и старењем. Поред тога, са старењем у неким ћелијама долази до нагомилавања крајњих оксидативних продуката, као што је липофусцински пигмент и акумулације протеинских филамената, што оптерећује ћелију и смањује њену функцију (Carey и сар, 2007; Beckman и сар, 1998; Brunk и сар, 2002).

**Метаболичка теорија (Rate of living).** Основна хипотеза метаболичке теорије је да је дуговечност обрнуто пропорционална интензитету метаболизма. Сваки организам

има ограничену количину метаболичког потенцијала, која се може квантитативно изразити количином потрошеног кисеоника или килокалорија током живота. Ова теорија не нуди адекватно објашњење дужине људског века, али је била основ за стварање теорије о слободним радикалима. Интензивни метаболизам за последицу има повећано стварање слободних радикала који даље оштећују протеине, липиде и нуклеинске киселине (Hulbert и сар, 2007; Carey и сар, 2007).

**Теорија унакрсног повезивања.** Старење ћелија базирано је на појави акумулације унакрсно исповезиваних протеина, који оштећују ћелију и уводе је у сенесценцу. Унакрсно повезивање молекула, пре свега колагена, чини га нерастворљивим и ригидним. То за последицу има промену ћелијске пропустљивости за нутријенсе. Услед међусобног повезивања молекула еластина, мења се структура везивног ткива, кожа постаје сува, смањене еластичности и тонуса. Уколико овај цео процес захвати и структурне протеине који имају улогу у деоби ћелије, онемогућена је деоба ДНК и митоза. До унакрсног повезивања долази због гликозилације аминокиселина на крајевима протеинских ланаца. Ове, тзв. AGE (advanced glycosylation end) продукте у екстрацелуларном простору разграђују макрофаги. Количина насталих AGE производа је сразмерна гликемији, па се њихово стварање може смањити калоријском рестрикцијом и повећањем физичке активности. У мозгу старих особа AGE се акумулирају и интрацелуларно, и екстрацелуларно. Неки од ових продуката делују токсично на два начина: иницијацијом стварања слободних радикала или повећањем подложности протеина протеолизи и деградацији (Grillo и сар, 2008).

**Теорија слободних радикала.** Једна од последица аеробног живота људског организма јесте и стварање слободних кисеоничних радикала. Осим кисеоничних реактивних врста, од значаја су и радикали азота. То су високо реактивна једињења са неспареним електроном, која могу да ступају у реакције са свим другим типовима хемијских једињења (протеини, липиди, угљени хидрати, нуклеинске киселине) стварајући нове слободне радикале. Овако настале ланчане реакције имају за последицу оштећење структуре и функције различитих ткива и органа, на целуларном и субцелуларном нивоу. Недавно је утврђено да сиртуини модулишу ћелијски одговор на оксидативни стрес и да су одговорни за продужење животног века код исхране базиране на калоријској рестрикцији. Велики број доказа указује да је овај ензимско/генски пут



вероватно најзначајнији механизам у развоју ћелијског старења и старења организма као целине (Yin и сар, 2014; Merksamer и сар, 2013; Dai и сар, 2014).

**Теорија соматских оштећења ДНК.** Молекули нуклеинских киселина, пре свага геномска ДНК, осетљиви су на различите ендogene и екзогене факторе. Они доводе до мутација на структурним и регулаторним генским елементима, а који, услед истих таквих мутација и грешака на репараторним механизмима, не могу увек бити исправљени. Акумулацијом таквих оштећења наступа сенсценца, а некада и смрт ћелије, што се на нивоу ткива и организма одражава као старење (Weinert и Timiras, 2003). Током старења долази и до епигенетских промена, тј. утишавања гена процесом метилације промотора и ацетилацијом хистона. Ови механизми учествују и у настанку тумора, где долази до утишавања тумор-супресорних гена. Тако, процес старења може бити регулисан посредством ДНК-деметиљујућих агенаса или инхибитора деацетилације хистона. Суртини, протеини кодирани генима *Sir 2, 3 и 4*, који се налазе на крајевима хромозома у близини теломера, укључени су у контролу старења ћелија, јер делују као деацетилазе (Burzynski и сар, 2003). Показано је да се са старашћу повећава хетерогеност генске експресије (Somel и сар, 2006).

### *1.7.2. Промене на мозгу током старења*

Старење мозга подразумева низ морфофункционалних промена које се јављају са старењем и нису у потпуности везане за хронолошки појам времена, већ показују велику варијабилност и индивидуалност. То је последица многобројних фактора који су удружени са старењем и доприносе старосних промена на другим органским системима, пре свега кардиоваскуларном и имунолошком. Антрополошке мере мозга (маса, запремина) промениле су се током последњих деценија, делом услед драматичних промена социо-економских услова живота. Сматра се да се током XX века, у развијеним земљама маса мозга се годишње увећавала за 1 грам. С друге стране, преваленца неуродегенеративних болести и исхемијских атрофичних промена, које доводе до смањења масе и запремине мозга, повећава се експоненцијално са старашћу. Ове чињенице отежавају компарабилност резултата студија које испитују старосне промене у ЦНС-у, а делом се ови проблеми превазилазе употребом савремених радиовизуелизационих метода (Esiri и сар, 2007; Chinta и сар, 2015).

Основне макроскопске промене које се јављају са старењем су смањена тежина и запремина мозга, увећање комора и проширеност сулкуса. Асоцијативни кортекс, неостријатум, хипокампус, мали мозак, као и дубоки путеви беле масе који повезују ове структуре су осетљивији на старење од примарног сензитивног кортекса, енториалног кортекса, палеостријатума, понса и одговарајуће беле масе (Raz и сар, 2006). Процентуално годишње смањење запремине мозга је 0,1-0,2% између 30. и 50. године живота, односно 0,3-0,5% после 70. године и постаје прогресивније са старењем (Esiri и сар, 2007; Sowell и сар, 2004). Са старењем долази до релативно дифузног и униформног смањења беле масе, док су промене на сивој маси више регионално распоређене, са изразитијем захватањем стријатума, као и фронталне и паријеталне коре више него темпоралне и окципиталне (Anderton и сар, 2002). На рачун смањења запремине мозга, шири се вентрикуларни систем (просечно за 2,9% годишње, а после 70. године и за 4,25%), а повећава запремина цереброспиналне течности. Такође, лептоменинге задебљавају и повећавају субарахноидални простор (Anderton и сар, 2002; Raz и сар, 2006; Esiri и сар, 2007). Наиме, постоји централна атрофија мозга (увећане латералне коморе) и кортикална атрофија, која се огледа у увећању сулкуса (Trollor и сар, 2001). Са старосћу, повећава се ширина, а смањује дубина сулкуса, нарочито у регијама кортекса одговорним за мултимодално процесирање информација (Raz и сар, 2006).

Микроскопске промене које се јављају на мозгу са старењем су бледило мијелина, губитак неурона (неокортекс, хипокампус, мали мозак), губитак мијелинских влакана у субкортексу, скврчавање и промене у морфологији неурона, акумулација липофусцина, смањење интензитета микроваскуларизације, смањена густина синапси, диференцијација, губитак дендритичних бодљи, кумулативно оштећење митохондрија, смањена способност репарације ДНК и немогућност уклањања неурона са оштећеном ДНК (Raz сар, 2006). Новија стереолошка трдомензионална испитивања промене броја неурона у старењу указују на то да је смањење броја неурона чак и у позном животном добу дискретно, а у неким структурама недетектабилно, нпр. у једрима кранијалних нерава. Насупрот томе, интензиван губитак неурона је примећен у можданој кори и хипокампусу, као и међу Пуркињеовим ћелијама малог мозга. Сматра се да је смањење укупне запремине мозга, или појединих његових делова, доминантно последица редукције величине ћелија (Esiri и сар, 2007; Hinman и сар, 2007; Keller и сар, 2006).

Истраживања су додатно отежана чињеницом да већина старијих особа, после 80. године, има различите патолошке промене на мозгу. Пре свега су то промене које су, када су присутне у већем броју, карактеристичне за Алцхајмерову болест (амилоидни плакови и неурофибриларна клупка), али и цереброваскуларну болест. Код здравих старих особа, ове промене се уочавају у много мањем броју, и ограничене су на хипокампус, амигдале и енторинални кортекс. Ултраструктурно, неурофибриларна клупка се састоје од упарених хеликоидних филамената (понекад и правих филамената) и указују на губитак нормалног цитоскелета од микротубула и неурофиламената (Anderton и сар, 2002). Међутим, код особа са Алцхајмеровом болешћу, она се могу наћи у свим деловима коре великог мозга. У мозгу се могу видети две врсте сенилних плакова: дифузни, присутни код већине старих особа, и неуритични, који доминирају у кортикалном и лимбичком делу мозга особа са Алцхајмеровом болешћу. Неуритични сенилни плакови су сферичне лезије величине до 200  $\mu\text{m}$  са централним амилоидним језгром, у чијем је саставу главни протеин амилоид- $\beta$ , које је окружено абнормалним едематозним неуритима. Амилоид покреће имунолошку активацију микроглија и узрокује смрт неурона (Lu и сар, 2013).

У мозгу који стари повишено је присуство убиквитина, протеина који има улогу у обележавању протеина за деградацију у протеазомима. Инклузије убиквитина се могу видети у глијалним ћелијама, а повећана је његова експресија и у отеченом мијелинском омотачу. Присуство коњугата убиквитин-протеин указује на старост мозга или на постојање неке неуродегенеративне болести – због оштећене функције протеазома акумулирају се недеградирани нефункционални комплекси протеина (Hinman и сар, 2007). Поред тога, уочава се пораст броја амилоидних тела (округла ламинирана гликопротеинска тела која се уочавају на ПАС пребојеним исечцима), која се накупљају периферно око крвних судова или близу пијалних и епендималних површина, као и у базалним ганглијама, хипокампусу и кичменој мождини. Број амилоидних телашаца драстично се повећава код оболелих од Алцхајмерове болести. Њихово присуство указују на постојање оксидативног стреса, дисункцију митохондрија и дисрегулацију гвожђа у астроцитима (Esiri и сар, 2007; Keller и сар, 2006; Lu и сар, 2013).

Са старењем се смањује густина капилара, нарочито после 50. године живота. Код особа са знаковима деменције, постоји израженије увртање и спирализација малих крвних судова, што је последица задебљавања базалне мембране капилара. То их чини

осетљивијим на ендотелну или луминалну компресију, а крвно-мождана баријера постаје пропустљивија. Дисфункција неурона која се јавља са старењем самим тим може бити последица отежаног транспорта глукозе и кисеоника кроз мембране. Промене на артеријама започињу најчешће на интими, већ у четвртој деценији је захваћено око 50% крвних судова, а промене су најизраженије на средњој церебралној артерији, док су артерије малог мозга и можданог стабла обично поштеђене. (Troller и сар, 2001; Hunter и сар, 2012). Ове промене представљају увод у атеросклерозу, и значајан су фактор ризика за цереброваскуларне догађаје. Морфометријска анализа броја капилара у сивој и белој маси мозга код неуролошки здравих старијих особа није показала статистички значајне разлике у односу на број капилара код пацијената са Алцхајмеровом болешћу. Међутим, сличност у микроваскуларној густини не одсликава нужно и функционалну једнакост. Са старењем долази не само до морфолошких промена, већ и до губитка инервације, што подржава хипотезу да и саме хемодинамске промене узрокују са старешћу удружене функционалне промене у ЦНС-у и когнитивно пропадање (Brown и Thore, 2011; Hunter и сар, 2012).

### *1.7.3. Промене хороидног плексуса повезане са старењем*

Хороидни плексус учествује у одржавању нормалних хомеостатских функција. Са старењем у ХП развијају се структурне и функционалне промене, које и саме могу доприносити старењу (Serot и сар, 2001, 2003). Све већи број студија указује на то да су промене ХП удружене са старењем у основи пропадања когнитивних функција и развоја неуродегенеративних промена у ЦНС-у код особа старије животне доби. Оваквом ставу доприносе закључци великог броја студија Алцхајмерове болести који указују на то да се у овој девастирајућој болести јављају практично исте анатомске промене као и у физиолошком старењу, али далеко већег интензитета, те су последични когнитивни и неуролошки поремећаји неупоредиво израженији (Duyskaerts и сар, 2010). Ове студије донеле су драгоцену сазнања о старењу ХП. Морфофункционалне промене у Алцхајмеровој болести могу се сликовито означити као егзацербација нормалног старења (Emerich, 2004). Физиолошко старење ХП обухвата структуралне и функционалне промене.

### 1.7.3.1. Морфолошке промене хороидног плексуса

Морфолошке промене ХП удружене са старењем обухватају епителну атрофију, стромалну фиброзу и повећање тежине ХП, при чему се уочавају благе варијације у зависности од врсте (Rubenstein, 1998). Са старењем епител хороидног плексуса човека се заравњава, односно висина епителних ћелија се смањује за 11% почев од рођења до 88. године живота. Код новорођене деце висина епителних ћелија ХП износи 15 $\mu$ м, док код особа у сенијуму она износи 13,7 $\mu$ м (Serot i sar, 2000; Preston, 2001). Редукција висине епителних ћелија код пацова почиње тек након 18 месеци старости животиња, што указује на то да заравњење епитела није нормалан, физиолошки феномен код младих животиња. Морфолошке студије старосних промена ХП код пацова су показале да епителијалне ћелије током старења подлежу значајној атрофији, те да се висина ћелија епитела са 12,5 $\mu$ м у шестом месецу редукује на 11,5 и 10,5 $\mu$ м у осамнаестом, односно тридесетом месецу. (Serot и сар, 2001). Код животиња које су жртвоване у 18. месецу запажају се и морфолошке промене у облику епителних ћелија, чији апикална, вентрикуларна површина задобија куполасти облик. Овај ефекат је још израженији у 30. месецу, када епителијалне ћелије постају заравњене са ирегуларним и елонгираним једрима, знатно краћим вилусима и присутним липидним вакуолама. Број микровила се смањује и они постају нерегуларно дистрибуирани. Поједине епителне ћелије развијају велике, апикалне, педункулицане цитоплазматске протрузије. Старење код миша је такође праћено порастом броја тамних, вероватно дегенерисаних, епителијалних ћелија, као и истањењем и елогирањем вилуса. Једра постају ирегуларна и издужена (Sturrock, 1988).

Са старењем повећава се и број интрацелуларних инклузија у цитоплазми епителних ћелијама. Инклузије могу бити двојаке: сачињене од продуката липидне пероксидације (депозити липофусцина) и протеинских влаканастих депозита, који личе на плакове сачињене од амилоида- $\beta$  који се налаза у Алцхајмеровој болести - Бионди влакнасти прстенови (Wen, 1999). Генерални пораст броја описаних инклузија које се накупљају у ћелијама епитела ХП достиже плато око 70. године код људи.

Поред промена у висини епитела, са старењем долази до задебљања базалним мембрана и самог епитела, као и базалне мембране ендотела капилара (Serot, 2001). Истовремено, повећава се дебљина везивног ткива које лежи испод базалне мембране. Базална мембрана епитела постаје ирегуларна и задебљала, са 95нм код новорођених, до

116nm код старијих индивидуа (Serot и сар, 2000). Код пацова овепромене су још израженије, са старењем базална мембрана епитела ХП готово двоструко повећава своју дебљину, са 100nm у 6. месецу на више од 200nm у 30. месецу. Ендотелијална базална мембрана такође задебљава, мада не у толико израженој мери.

Структуралне промене удружене са старењем евидентне су и на строми ХП. Строма задебљава, у њој се повећава садржај колагена влакна са развојем ирегуларне фиброзе строми. Могу се уочити хијалина и масна дегенерација, као и формирање циста. Пијалне ћелије строми у својој цитоплазми депонују липидне капљице. Број макрофага и дендритичних ћелија строми се значајније не мења. Колмерове епиплексусне ћелије присутне на вентрикуларној површини епитела ХП, могу у цитоплазми имати велики број масних вакуола, које могу имати и велике димензије, што ћелијама даје пенаст или шупљикав изглед. Повећава се садржај и густина хијалиних телашаца, калцификата и псамоматозних телашаца, при чему зид локалних артерија постаје фрагментиран и задебљао (Shuangshoti и Netsky, 1970; Serot и сар, 2003; Emerich и сар, 2004). Старосне промене описане су и на крвним судовима строми пацова. На фенестрираним капиларима уочава се регуларно, равномерно задебљање базалне мембране ендотела, док се у артериолама, заступљенијим у базалним, коренским деловима хороидних папила, види задебљање медије, са пратећом фиброзом и фрагментацијом еластичних влакана и задебљање адвентиције (Serot и сар, 2001). Хијалина телашца, калцификати и псамоматозна телашца се у литератури наводе претежно као старосна промена строми ХП човека, а не и експерименталних животиња (Rubenstein, 1998). У ХП човека утврђено је да је присуство већег броја псамоматозних телашаца у строми хороидног плексуса удружено са израженијом атрофијом епитела, заравњењем епителне површине и стварањем цистичних формација у ХП, односно променама које карактеришу физиолошко старење ХП. Занимљиво је да је удруженост описаних промена са присуством већег броја псамоматозних телашаца уочена и код млађих особа (Jovanovic и сар, 2009).

#### 1.7.3.2. Функционалне промене хороидног плексуса

Стопа продукције ЦСТ у хороидном плексусу опада са старењем (Damkier и сар, 2013, Preston, 2001). Са друге стране, запремина ЦСТ се са годинама живота повећава

услед физиолошке, сенилне атрофије мозга, која је благог до умереног степена код здравих старих особа, и повећаног отпора у путевима дренаже ЦСТ (Albeck, 1998). Запремина можданих комора повећава се за 25-30% код људи старости 50-80 година, у односу на старосну групу 20-40 година (Pfefferbaum и сар, 1994). ЦСТ заузима 7-9% укупне запремине интракранијалног простора код адолесената, али овај проценат убрзо почиње да се повећава већ од треће деценије живота, да би у осмој деценији достигао 20-333% интракранијалног волумена (Courchesne и сар, 2000). Ове промене су много наглашеније у неуропатолошким стањима, као што се шизофренија и деменција (Nagy и сар, 2003). Атрофија мозга подразумева опадање запремине сиве масе за око 5% по деценији почев од адолесценције. Бела маса до сенијума остаје релативно очувана, али ипак се редукује за 13% између 40. и 80. године (Redzic, 2005).

У току старења долази и до промена у ензимској активности ХП, што се одражава на одвијање нормалног целуларног метаболизма. Функционално испитивање ХП пацова показало је да синтеза лактат и сукцинат дехидрогеназе опада за 9%, односно 26% током живота пацова (Ferrante и сар, 1987). Током старења долази до значајног пораста броја епителних ћелија које престају са продукцијом цитохром С оксидазе, што доводи до поремећаја оксидативног метаболизма митохондрија и продукције АТФ (Cottrell и сар, 2001). Истовремено, долази и до опадања синтезе  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азе и  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  котранспортера (Preston, 1991). Ове анатомске и ензимске промене доприносе смањењу секреције ЦСТ. У анималним моделима долази до пада секреције ЦСТ и до 45%, али студије изведене на људима су дале контраверзне резултате (Preston, 2001). Потпуна замена садржаја ЦСТ дуже траје код старијих пацова (7,9 сати) у односу на младе пацове (2,2 сата), што је последица смањене секреције ЦСТ и повећања запреминског удела ЦСТ због атрофије мозга. Код људи запремина секретоване ЦСТ се смањује са старењем, са 0,41мл/мин. у 28. години живота на 0,19мл/мин. у 77. години живота. Промет ЦСТ се смањује код старих особа као резултат церебралне атрофије, и ЦСТ се код људи у сенијуму у потпуности измени мање од 2 пута на дан, док се код младих за 24 часа промени три до четири пута (Preston, 2001).

Повећан отпор у отицању ликвора такође може да доприноси повећању садржаја ЦСТ у старењу. Повећан отпор у отицању ликвора делом је последица фиброзе можданих опни, што доводи до смањења степена дренирања ликвора путем арахноидалних гранулација. Повећање отпора отицању ЦСТ може допринети и

повећање централног венског притиска услед васкуларне болести (Rubenstein, 1998). Повећање волумена ЦСТ, смањење стопе његове секреције и редукована дренажа резултују генерализованим падом промета ЦСТ. Ово доводи до пораста односа концентрација у ЦСТ/крвној плазми који је завистан од година старости, за многе супстанције које се нормално уклањају из мозга дренажом путем ликвора. У ову групу супстанција чији се однос концентрација у ЦСТ и плазми мења, тј. расте са старењем, спадају и многи протеини, као што су албумин и имуноглобулини IgG (Garton и сар, 1991). Ове старосно условљене промене у саставу ЦСТ не смеју бити погрешно интерпретиране као последице једноставног механичког оштећења крвно-мождане или крвно-ликворске баријере.

Са старењем у епителним ћелијама ХП повећава се инциденца појаве амилоидних интрацелуларних депозита, а у патолошким стањима њихов број је још израженији. У Алцхајмеровој болести број амилоидних депозита повећава се у епителним ћелијама ХП, док се у системској амилоидози број амилоидних телашаца повећава у ендотелним ћелијама крвних судова (Sasaki и сар, 1997; Wen и сар, 1999). Утицај акумулације ових депозита на функцију хороидног плексуса може се одразити поремећајем секреције ЦСТ. Поред тога, студије су указале да се амилоид- $\beta$  који се налази у ЦСТ и доприноси стварању депозита који се могу видети у мозгу, управо производи и потиче из самог хороидног плексуса (Preston и сар, 2001). Генерално смањење промета ЦСТ, које се нормално развија са старењем, сматра се важним фактором у развоју Алцхајмерове болести, јер се смањује и стопа којом се отпадни продукти одводе из мозга. Такође, сматра се да продужење контактеног времена протеина са глукозом у цереброспиналној течности, а које је последица редукованог клиренса ЦСТ, интензивира гликозилацију протеина ликвора и повећава оксидативни стрес (Shuvaev и сар, 2001). Код пацијената са Алцхајмеровом болешћу, промет ЦСТ, самим тим и клиренс ЦСТ снижен је за 50%. Снижени промет ЦСТ и повећана акумулација амилоида- $\beta$  могли би бити повезани са смањењем активности  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азе у хороидном плексусу која наступа са старењем (Silverberg и сар, 2003).

Епителне ћелије ХП имају непосредну улогу у уклањању протеина из ЦСТ путем рецепторима посредоване ендцитозе. Она се одвија помоћу рецептора као што су протеин-1 и протеин-2 придружени рецептору за липопротеин мале густине (LRP-1 и мегалин). Број LRP-1 рецептора у ХП расте са старењем, док се број мегалинских



рецептора смањује. Након стимулације амилоидом- $\beta$ , LRP-1 рецептор се одваја са мембране епителне ћелије ХП. Ово доводи до акумулације амилоида- $\beta$  у ЦСТ у форми везаној за рецептор LRP-1, што спречава агрегацију амилоида и одржава га у диспергованом стању. Везана форма амилоида- $\beta$  може да се елиминише путем ликвора из ЦНС-а и затим разгради у системској циркулацији (Liu и сар, 2009). Сматра се да мегалин доприноси уклањању амилоида- $\beta$  преко хороидног плексуса (Hammad и сар, 1997). Значајна редукција броја мегалинских рецептора забележена је у епителу ХП код оболелих од Алцхајмерове болести (Alvira-Botero и сар, 2010; Pascale и сар, 2011). Мегалин учествује у транспорту растворених супстанција из крви и ЦСТ у хороидни плексус, али је судбина ових супстанци непозната. Могуће објашњење је да се транспортоване супстанце разграђују унутар самог хороидног плексуса или трансцитозом преносе кроз епитему ћелију. Измењена експресија и једног и другог рецептора (LRP-1 и мегалин) може довести до акумулације амилоида- $\beta$  у ЦСТ. Међутим, још увек није разјашњено да ли ове промене удружене са старењем, када су присутне у великој мери функционишу као узрок или последица патолошких промена које се виде у Алцхајмеровој болести.

Са старењем долази до промена и на нивоу транспорта витамина у ЦСТ на нивоу хороидног плексуса. Код пацијената старије животне доби, као и код оболелих од Алцхајмерове болести, запажен је пад концентрације витамина В<sub>12</sub> и фолата у цереброспиналној течности (Ikeda и сар, 1990), за шта је у *in vitro* условима доказано да доводи до повећања нивоа тау протеина, који се акумулира у Алцхајмеровој болести и чија се акумулација сматра непосредним узроком оштећења неурона (Ho и сар, 2003). Редукован ниво антиоксиданаса у ЦСТ, пре свега аскорбинске киселине, доприноси когнитивном пропадању који се региструје са старењем (Bowman и сар, 2009).

## 1.8. Псамоматозна телашца

### 1.8.1. Биоминерализација и ектопична калцификација

Биоминерализација је процес стварања неорганских кристалних структура у екстрацелуларном матриксу и добро је познат феномен у хуманој патологији. У овом

процесу најпре долази до ослобађања фосфата из ћелијских мембрана активношћу ензима фосфатаза, за које се електростатичким силама везује калцијум. Тако настаје језгро од кристалног калцијум фосфата, које служи као нидус за даље таложење екстрацелуларног дебрија и развој калцификација. Феномен биоминерализације може се манифестовати у виду добро познате појаве псамоматозних телашаца, која се могу наћи у хороидном плексусу и бројним бенигним и малигним патолошким стањима, попут менингеома, тумора штитасте жлезде, ендометријалног карцинома, шванома, соматостатинома и тумора јајника. Псамоматозна телашца (ПТ) су микрокалцификације које хистолошки имају изглед базифилних, луковичастих, ламелираних сфероидних структура. (Cisar, 2000; Eghbali-Fatourehchi, 2007; Kumar и сар, 2009; Vai и сар, 2009).

Калцификација представља процес таложења соли калцијума, у облику калцијум-фосфата и калцијум-карбоната, у различитим меким ткивима, заједно са малим количинама гвожђа, магнезијума и других минералних соли. Калцификација ткива може бити физиолошка, дистрофијска и метастатска. У физиолошкој калцификацији остеобласти стварају остеоидни матрикс, који омогућава депозицију хидроксиапатита на колагеним влакнима. Нефизиолошки облици калцификације подразумевају процес биоминерализације било где у меким ткивима која нормално не осификују, те се означавају и као ектопична калцификација. Дистрофијска калцификација одвија се у фокусима ткивне некрозе или некробиозе, док се метастатска патолошка калцификација одвија у условима повишене концентрације калцијума у крви, у срединама пресићеним калцијумом и фосфатима или оксалатима. Додатни механизам који би могао узроковати ектопичну калцификацију укључује присуство циркулишућих ћелија остеобластне лозе или ткивно-специфичне мезенхимне ћелије са остеогеним потенцијалом. Оне могу бити привучене у ткива локалним сигнаlima, који настају услед метаболичких промена у ткиву, где се насељавају, активирају и иницирају локалну ектопичну калцификацију (Eghbali-Fatourehchi, 2007; Kumar и сар, 2009).

Најкомплекснији облик ектопичне калцификације је ектопична осификација (Manjila и сар, 2013). Осификација почиње диференцијацијом остеобаста из мезенхимне ћелије, плурипотентне ћелије са својствима матичности, која насељава строму различитих ткива и органа, где служи као извор за потенцијалну диференцијацију у зреле мезенхимне ћелије типичне за ткиво (Dominici и сар, 2006). Мезенхимне матичне ћелије присутне у строми нормалних органа, али и строми тумора и имају потенцијал да

се развијају у различита ткива (Mathews и сар, 1974, Манџила и сар, 2013). Мезенхимна ћелија се диферентује у преостеобласт под утицајем сигналног фактора Runx2. Runx2 иницира експресију коштаних морфогенетских протеина и инхибира диференцијацију мезенхимне ћелије у хондроците или адипоците (Komogí и сар, 2006). Коштани морфогенетски протеини (bone morphogenetic proteins - BMP) способни су да наставе даљи процес диференцијације. Наиме, за сада је утврђено да 9 од 20 познатих коштаних морфогенетских протеина има способност да самостално индукује стварање ектопичне кости путем диференцијације мезенхимне ћелије у остеобласт у анималним моделима (Kim и сар, 2011). Након диференцијације у преостеобласт, ћелија задржава плурипотентност и још увек се може развијати у правцу хондроцита. Овај молекуларни пут инхибира  $\beta$ -катенин, док експресија још једног кључног фактора остеогенезе, остерикса, промовише сазревање у незрели остеобласт, инхибирајући притом хондроцитну диференцијацију. За овај корак неопходно је учешће оба ова фактора, и  $\beta$ -катенина и остерикса. Незрели остеобласти стварају остеопонтин, док зрели стварају остеокалцин, те ови протеини представљају маркере присуства остеобласта (Комори, 2006).

Феномен калцификације и осификације забележен је у различитим ненеопластичним и неопластичним ткивима. Осеална метаплазија описана је као инцидентални налаз у многим органима: ендометријуму, јајницима, грлићу материце, слузокожи синуса (Umashankar T и сар, 2010). Још пре четири деценије, Mathews and Moossy (1976) сугерисали су шест могућих теорија осификације у туморима: везивно-ткивну метаплазију, неуроепителну трансформацију у мезенхимна ткива, тератомско порекло, хетероплазију околног ткива, мешовиту природу туморских ћелија и мукоидну дегенерацију. Неке од ових теорија су веома мало вероватне и никада нису експериментално потврђене. Новија истраживања указују на то да је дистрофијска калцификација важан механизам осификације у бенигним неоплазмама (Bai и сар, 2009; Манџила и сар, 2013).

### *1.8.2. Патогенетски механизми настанка псамоматозних телашаца*

Псамоматозна телашца су концентричне, ламелиране, калцификоване структуре, назване тако због морфолошке сличности са зрнцима песка и сматра се да представљају дистрофијску калцификацију, где се депозиција калцијума одвија у невијабилним или некробиотичним, умирућим ткивима, у условима нормалног нивоа серумског калцијума и у одсуству поремећаја метаболизма калцијума (Kumar и сар, 2008). У цитолошким препаратима ПТ су калцификоване, концентричне сфероидне форме величине 50-150  $\mu\text{m}$ , округлог облика и стакластог изгледа и боје се тамноплаво до црно на препаратима бојеним Geimsa методом и мрко до црно на Papanicolaou обојеним размазима (Triggiani и сар 2008). Псамоматозна телашца нормално су присутна у строми хороидног плексуса човека у свим узрастима. Са старењем њихова величина се повећава и у њима се могу јавити пратеће морфолошке промене (Modic и сар, 1980; Jovanović и сар, 2004, 2007, 2014).

У процесу дистрофијске калцификације, појединачна некротична ћелија чини језгро, зачетак кристала, и бива прожета минералним депозитима, док прогресивно додавање спољашњих слојева ствара ламелирану конфигурацију, те тако настаје ПТ. Дистрофијска калцификација одвија се кроз две главне фазе: иницијација (нуклеација) и пропација, које се могу одигравати интра- или екстрацелуларно. Док се иницијација интрацелуларних калцификација дешава у митохондријама мртвих или умирућих ћелија, иницијатори екстрацелуларне калцификације су фосфолипиди садржани у мембранама везикула, коју су величине око 200 nm (Virtanen и сар, 1976; Tunio и сар, 1998; Kumar и сар, 2008). Yamashima и сарадници пронашли су да матриксне грануле без мембране, које су такође присутне заједно са малим бројем мембранозних матриксних везикула и матриксних минерала у вилусним микросржима хуманих арахноидалних вилуса, могу имати улогу примарних нидуса калцификације у формирању ПТ. Могући механизам биосинтезе матриксних везикула је екструзија преформираних арахноидалних ћелијских структура или секреција финог, зрнастог материјала који се екстрацелуларно склапа (Yamashima, 1986). Анализирајући компоненте ПТ у менингеомима, Creda-Nicolas је сугерисао да су иницијатори формирања ових калцификујућих телашаца капилари и дегенеративно измењене ћелије (Creda-Nicolas, 1992).

Док су морфолошке и епидемиолошке карактеристике ПТ релативно добро описане, етиопатогенетски механизми настанка ПТ у ХП још звек нису у потпуности расветљени. Поред тога, познато је да се ПТ неретко јављају у неопластичним процесима чија је важна морфолошка карактеристика формирање папила. Дакле, папиларна морфологија заједничко је обележје хуманог хороидног плексуса, који нормално може садржати ПТ, и бенигну и малигну неопластичних процеса. Појави ПТ у туморским процесима посвећена је много већа пажња истраживача, али значајније структурне разлике између ПТ хороидног плексуса и ПТ насталих у патолошким стањима за сада нису описане (Korzhevskii и сар, 1997; Van Miegheem и сар, 2004; Jovanović и сар, 2010).

На основу публикованих резултата бројних студија, сматра се да ПТ у папиларним туморима обично настају у облику прекурсорских форми у фиброваскуларној сржи папиларних, ресичастих пролиферата. Ове прекурсорске форме сачињене су од колагених влакана и мембранозних везикула које секретују туморске ћелије, а који се слажу и ређају у наизменичне, прстенасте, концентричне слојеве. Наизменични прстенови у прекурсорским телашцима вероватно представљају слојеве које садрже матриксне везикуле, које подлежу калцификацији (Das и сар, 2009). Стога, депозиција колагеног материјала и мембранозних везикула у виду концентричних слојева, који се наизменично смеђују у папиларним пројекцијама, и њихова следствена калцификација, која доводи до формирања ПТ, може представљати хистолошки принудни, неизбежни феномен, као што је то у случају стварања епителних ракових перли у инвазивном сквамозноћелијском карциному са орожавањем.

Већина истраживања везаних за патогенезу ПТ рађена је на менингеомима. Још пре више од четири деценије Klose је описао значај повезаности еластичних влакана, крвних судова и формирања ПТ у менингеомима (Klose, 1961). У студији базираној на скенинг електронској микроскопији, Virtanen и сарадници описали су ПТ као структуре сферичног облика, пре него тубуларне тродимензионалне формације како се раније претпостављало, са таласастом површином покривеном испреплетаним влакнима; на попречном пресеку ова телашца имала су ламелирану унутрашњу структуру са концентричним сноповима и влакнима удруженим са кристалоидним материјалом (Virtanen и сар, 1976). Ови истраживачи закључили су да структуре ПТ уочене електрономикроскопски говоре у прилог генезе ПТ путем калцификације концентрично депонованог фибриларног екстрацелуларног материјала. Овај процес минерализације

могао би представљати и дистрофичну калцификацију менингоцитних ћелија. Узимајући у обзир присуство остатака дегенерисаних ћелија, матриксних везикула и циновских телашаца са или без минерализованих депозита у периваскуларним подручјима менингеома, аутори су сугерисали да стварање ПТ у неким менингоцитним вртлозима може бити одраз дегенерације, а затим и биоминерализације неких од ћелија централне позиције (Kubota и сар, 1985). Након дегенерације менинготелијалне ћелије, матриксне везикуле и матриксна циновска телашца која из ње настају секвестрирају кристале хидроксиапатита, а затим следи екстензија процеса минерализације на околна везивоткивна влакна, што доводи до формирања ПТ. Међутим, анализирајући компоненте ПТ у менинеомима, као и друге елементе тумора, попут капилара и дегенеративних ћелија, које се класично сматрају иницијаторима стварања ових калцификованих структура, Creda-Nicolas је донео закључак да је стварање ПТ примарно индуковано колагеним влакнима које синтетишу менингоцити (Creda-Nicolas, 1992). Штавише, туморске ћелије одговорне су и за радијални раст и сферичну форму минерализације. Tsuchida и колеге констатовали су да ПТ у менинеомима настају услед продукције колагених влакана од стране туморских ћелија, што је праћено облитерацијом и ишчезавањем наставака туморских ћелија (Tsuchida и сар, 1996). Kubota и колеге запазили су и описали значајну количину колагених влакана унутар великих ПТ, али нису прецизније елаборирали извор колагена. Док матриксне везикуле, вероватно произведене од стране менинготелијалних ћелија, могу функционисати као нидуси калцификације, колагена, као и еластична влакна, која леже у околини и паралелно кристалима апатита у менингоцитним вртлозима, могла би имати важну улогу у оријентацији кристалних депозита током раста екстрацелуларних ПТ (Kubota и сар, 1984).

У трансмисионој електрономикроскопској студији о ПТ у бенигним и малигним папиларним серозним неоплазмама јајника, Ferenczy и колеге запазили су да се стварање ПТ иницира интрацелуларно, како у неопластичним епителним ћелијама, тако и у стромалним хистиоцитима (Ferenczy и сар, 1977). Њихови резултати обезбедили су поткрепљујуће доказе који подржавају концепт да су ПТ у оваријалним папиларним серозним неоплазмама последица дистрофијске калцификације удружене са ћелијском дегенерацијом. Они су закључили да би иницијално место усађивања апатитских кристала могле бити липидима богате интрацелуларне везикуле, које настају из дехисцентног туморског ткива и бивају аутофагоцитоване од стране самих туморских

ћелија или подлежу хетерофагоцитози од стране хистиоцита. Са друге стране, велика, екстрацелуларна ПТ настају као резултат фузије калцификованих телашаца која бивају избачена из калцификованих ћелија.

У истраживању које је обухватило светлосномикроскопску и ултраструктурну анализу, Kozlovskii и сарадници пратили су све стадијуме формирања ПБ на субмикроскопском нивоу (Kozlovskii и сар, 1978). Они су описали да ПТ настају као резултат депозиције микрокрстала апатита, која се надовезује на акумулацију протеинске супстанце у ергоплазматским цистернама и на митохондријалним кристама, стварајући тако интрацитоплазматске инклузије. Ове инклузије временом конфлуирају, уз континуирану депозицију кристала, да би у једном моменту у потпуности испуниле ћелију, што доводи до њене смрти и ослобађања малих ПТ.

Сматра се да је процес апоптозе укључен у настанак ПТ, јер апоптотска телашца могу концентрисати калцијум у кристалној форми. Апоптотичне ћелије бивају фагоцитоване одмах по стварању апоптотских телашаца, у највећој мери од стране макрофага. Поред тога, остеопонтин секретујући макрофаги су узрочно повезани са депозицијом калцијум фосфата у ПТ (Kiyozuka и сар, 2001). У серозном папиларном аденокарциному јајника CD68-позитивни макрофаги и повећан број ћелија у апоптози, детектованих имунохистохемијском реакцијом на једноланчану ДНК, преваходно су били присутни у непосредној близини ПТ. Висока стопа апоптозе могла би да доприноси повољнијој прогнози код серозног оваријалног карцинома са псамоматозним телашцима. Утврђено је да серозни карциноми јајника са више од 5% области са ПТ имају патогенетски профил различит од већине серозних карцинома, који нису удружени са ПТ и имају мутантну форму *TP53* гена. Карциноми јајника са евидентним присуством ПТ удружени су са дивљим типом *TP53*, који кодира синтезу функционалног протеинског продукта и индукује апоптозу. Стога присуство ПТ у серозном оваријалном аденокарциному индикатор је боље прогнозе и удружено је са дужим преживљавањем пацијената (Motohara и сар, 2010)

Недавно је објављена компаративна анализа састава и концентрације неорганских елемената у ПТ папиларног карцинома штитасте жлезде и серозног цистаденокарцинома јајника (Olivera Merlin и сар, 2012). Утврђено је да ПТ код оба типа карцинома имају сличну минералну структуру. Концентрација калцијума, бакра и гвожђа била је десет пута виша у ПТ него у околном туморском ткиву. Ова разлика у

концентрацији катјона, пре свега калцијума, последица је повећаног садржаја калцијум везујућих протеина који су удружени са ПТ, пре свега коштаних морфогенетских протеина и остеопонтина. Новија истраживања указују на то да у формирању ПТ велики значај имају калцијум везујући протеини, које секретују стромалне ћелије (Kiyozuka и сар, 2001; Ito и сар, 2005).

#### 1.8.2.1. Улога остеопонтина у биоминерализацији

Остеопонтин је гликозилисани фосфопротеин екстрацелуларног матрикса који се може наћи у различитим ткивима попут костију, зуба, бубрега и неким епителним ткивима. Његова синтеза кодирана је геном *OPN*, лоцираном на хромозому 4q21-25. Присутан је у свим телесним течностима, укључујући крвни серум и млеко у току дојења. У обилној количини присутан је у коштаном матриксу, где учествује у минерализацији и регулацији функције остеобласта у току стварања коштаног ткива. Остеопонтин показује високи афинитет везивања за хидроксиапатит. Остеопонтин игра бројне улоге у физиолошким и патолошким процесима као што су ћелијска адхезија и миграција, ангиогенеза, антиапоптоза, имунолошки одговор, запаљење и зарастање рана (Nomiyama и сар, 2007; Gursoy и сар, 2010). Своје плејотропне ефекте испољава делујући преко различитих рецептора. Захваљујући аминокиселинској секвенци Arg-Gly-Asp везује се за интегрине, као и за CD44 (Anborgh и сар, 2011; Subramani и сар, 2015).

Остеопонтин је укључен како у регулацију физиолошке, тако и патолошке минерализације. У нормалном коштаном ткиву, остеопонтин се експримира и у остеобластима и у остеокластима, ћелијама које су задужене за ремоделирање костију, и учествује у ресорпцији коштаног ткива (Yoshitake и сар, 1999; Ihara и сар, 2001; Mazzali и сар, 2002). Проминентна експресија остеопонтина присутна је у подручјима дистрофијске калцификације, попут оних удружених са дегенеративном и атеросклеротском васкуларном болешћу (Hirota и сар, 1993; Shanahan и сар, 1994; Srivatsa и сар, 1997). Експериментални резултати на *in vitro* моделу калцификације глаткомишићних ћелија указују на то да остеопонтин испољава инхибиторне ефекте на овај процес (Wada и сар, 1999), што би могло ићи у прилог закључку да усходна регулација остеопонтина која је евидентна у подручјима дистрофијске калцификације представља покушај да се васкуларна калцификација или превенира или, у најмању



руку, ограничи. Међутим, новије студије указале су да остеопонтин може деловати као сржни протеин у нидацији калкулуса у холецистолитијази. Остеопонтин је детектован у централним деловима калкулуса, у епителу калкуозне жучне кесе, као и у макрофагима који инфилтришу слузокожу (Ichikawa и сар, 2009).

У физиолошким условима, остеопонтин у највећој мери производе остеобласти у формираним коштаном гредицама, док је стварање остеопонтина у макрофагима забележено у условима када долази до настанка ектопичне калцификације. Резултати истраживања показали су да је депозиција калцијум фосфата конзистентна са присуством остеопонтина, те се сматра да остеопонтин има важну улогу у настанку ектопичне калцификације. Информациона РНК остеопонтина детектована је у стромалним макрофагима који се групишу око фокуса калцификације у различитим болестима и стањима. Тако је присуство mRNA остеопонтина доказано у макрофагима код атеросклерозе, карцинома дојке, менингеома, пиломатрикома (калцификујућег епителиома коже), као и у карциному штитасте жлезде (Tunio и сар, 1998; Hirota и сар, 1991, 1995, 1995, 1995).

Присуство остеопонтина детектовано је методом *in situ* хибридизације у калцификованим деловима псамоматозних телашаца у серозном папиларном цистаденокарциному јајника. У испитиваним узорцима оваријалног карцинома, остеопонтин је био имунопозитиван у готово сваком ПТ, док присуство остеокалцина и остеоонектина није запажено. Остеопонтин притом није детектован ни у једном од околних типова ћелија, али је зато остеопонтинска mRNA детектована у CD68-позитивним макрофагима који инфилтришу строму тумора, што указује на то да се остеопонтин ствара у макрофагима, а затим промтно секретује ван ћелије. Након ове брзе транслокације из хистиоцита у којима се синтетише у екстрацелуларни простор, остеопонтин се импрегнише у ПТ, што може указивати на узрочну повезаност секреције остеопонтина са депозицијом калцијум фосфата у форми псамоматозних телашаца. Иако није позната тачна улога калцификације повезане са секрецијом остеопонтина од стране макрофага, депозиција калцијума у облику ПТ могла би да доприноси кориговању стања хиперкалцемије које постоји у околини канцерских ћелија (Maki и сар, 2000; Anborgh и сар, 2011).

Експресија остеопонтина описана је у ПТ папиларног карцинома штитасте жлезде, где је депозиција овог протеина доказана методама Northern blotting и *in situ*

хибридизације (Tunio и сар, 1998). Експресија остеопонтинске mRNA детектована је у неопластичним ћелијама канцерског ткива, али не и у околном, очуваном ткиву штитасте жлезде. Ћелије које експримирају остеопонтинску mRNA биле су присутне у непосредној околини ПТ и на основу позитивности на CD68, идентификовано је да су те ћелије заправо макрофаги. Истраживање Wuа и сарадника показало је да је експресија остеопонтин статистички значајно виша у узорцима папиларног карцинома са калцификацијама, него у туморима без калцификација, где је убрајано формирање псамоматозних телашаца, стромална калцификација и формирање коштаног ткива (Wu и сар, 2015). Поред тога, утврђено је да остеопонтин има способност да индукује прекомерну експресију једног од својих рецептора, CD44 (Guarino и сар, 2005).

Познато је да је остеопонтин укључен у настанак ПТ у менингеомима (Hirota и сар, 1995). Имунохистохемијска анализа експресије остеопонтин код 139 тумора мозга показала је да већи интензитет имунореактивности у туморским ћелијама корелира са порастом градуса за менингеоме и неке глиоме. Наиме, више од 90% менингеома WHO градуса I било је негативно на остеопонтин или је показивало слабо бојење, док је 100% менингеома WHO градуса II и III било позитивно (Tsai и сар, 2012). Поред тога, остеопонтин је користан биомаркер за предвиђање рецидива менингеома најнижег градуса, што омогућава бољу стратификацију пацијената у доношењу одлука о терапији. У псамоматозној варијанти менингеома, ПТ су показивала интензивну имунореактивност на остеопонтин, без обзира на експресију протеина у туморским ћелијама (Ankok и сар, 2014).

#### 1.8.2.2. Улога остеокалцина у биоминерализацији

Остеокалцин је секреторни протеин сачињен из 49 аминокиселина, кога у највећој мери стварају остеобласти. Мале количине остеокалцина стварају одонтобласти зуба и хипертрофични хондроцити. Остеокалцин спада у групу протеина кости који садрже  $\gamma$ -карбоксиглутаминске киселинске остатке и ширу фамилију витамин К зависних протеина, коју углавном чине протеини примарно укључени у коагулацију. У матриксу кости остеокалцин везује за јоне калцијума у молекулу хидроксиапатита (Hauschka и сар, 1989; Willems и сар, 2014; Zoch и сар, 2016).

Експресија остеокалцина прецизно је регулисана и специфично зависи од развојне фазе током остеобластне диференцијације (Li и сар, 2016). Остеокалцин се не експримира током раних фаза остеобластне диференцијације, већ је искључиво маркер касних, зрелих остеобласта (Bellows и сар, 1999). Са минерализацијом екстрацелуларног матрикса који стварају остеобласти, експресија остеокалцина нагло расте, и до две стотине пута. Зато се остеокалцин сматра специфичним маркером касне фазе стварања кости. Иако се mRNA остеокалцина може детектовати у екстраскелетним ткивима, изгледа да се транскрипт ван коштаног ткива непотпуно исеца и задржава неку од интронских секвенци, те изостаје транслација mRNA у протеин у цитоплазми. Функционални протеин настаје само у коштаном микроокolini (Jung и сар, 2001, Li и сар, 2016).

Због свог високог афинитета за везивање калцијума остеокалцин се може наћи у различитим калцификованим ткивима (Brennan-Speranza и сар, 2015). Fleet и сарадници су детектовани ниску експресију остеокалцинске mRNA у фокусима дистрофијске калцификације некротичних или некробиотичних жаришта у већини паренхиматозних органа (јетра, плућа, мозак), цревима, мишићном ткиву (Fleet и сар, 1994). Експресија је забележена и у ткиву костне сржи, пре свега у ћелијама адипоцитне линије и глаткомишићним ћелијама. Експресија остеокалцина нађена је у здравој аорти, док се током атеросклеротске калцификације ниво експресије значајно повећава. Пораст остеокалцинске експресије у атеросклеротичној лезији промовише трансформацију фибробласта адвентиције у миофибробласте (Dhore и сар, 2001; Yuen и сар, 2012).

Остеокалцин је важна компонента екстрацелуларног матрикса кости и други најзаступљенији протеин у костима после колагена (Li и сар, 2016). Када се излучи у микросредину коштаног ткива, остеокалцин подлеже конформационим променама тако да се калцијум-везујући карбоксилисани остаци поравњавају са калцијумским јонима у кристалу хидроксиапатита и са њима успостављају чврсте везе. У коштаном ткиву остеокалцин учествује у одржавању минералне хомеостазе и обезбеђивању механичких својстава кости, значајних за њихову протективну и локомоторну функцију (Charurlat и сар 2016). Иако је обилно присутан у матриксу коштаног ткива, улога остеокалцина у коштаном ткиву још увек није у потпуности расветљена. Остеокалцин чврсто везује хидроксиапатит и формира комплекс са колагеном помоћу још једног матриксног протеина, остеопонтина. Остеокалцин се поставља и функционише као мост, обезбеђујући повезивање матрикса и минералних компоненти коштаног ткива (Ritter, 1992, Hoang, 2003). Остеокалцин учествује и у регулацији коштане ресорпције, јер

стимулише диференцијацију и сазревање остеокласта (Ishida M и сар, 2004). Поред тога, у *in vitro* условима испољава хемотаксична својства на дозно-завистан начин. Он индукује хемотаксу већег броја ћелија, укључујући моноците, преостеокласте, али и ћелије карцинома дојке и остеосаркома (Mundy GR и сар, 1983, Li и сар, 2016).

Поред структурне улоге у коштаном матриксу и регулатроне улоге у минерализацији, остеокалцин који се ослобађа у циркулацију испољава хормонска својства. Ова слободна, циркулишућа форма остеокалцина, чији је ниво регулисан дејством инсулина на кости, делује механизмом повратне позитивне спреге на повећање пролиферације  $\beta$ -ћелија панкреаса, као и на инсулинску продукцију и секрецију, док на нивоу скелетно-мишићног и масног ткива повећава њихову осетљивост на инсулин. Поред тога, остеокалцин испољава ефекте и на нивоу možданог ткива, пре свега možданог стабла и хипокампуса, где повећава синтезу неуротрансмитера стимулишући когнитивне процесе и памћење. На нивоу тестиса повећава стварање тестостерона (Zoch и сар, 2016; Li и сар, 2016).

#### 1.8.2.3. Улога нанобактерија у биоминерализацији

Новија истраживања указују на то да биоминерализација може бити тесно повезана са нанобактеријама. Нанобактерије су инфективни агенси нанометарских (80-500 nm) димензија са способношћу да врше нуклеацију кристала хидроксиапатита и расту у култури, а који су присутни у стањима удруженим са калцификацијом и псамоматозним телашцима (Kajander и сар, 1998. и 2006; Ciftcioglu и сар, 1999). Њихова својства као што су цитотоксичност *in vitro* и *in vivo*, мале димензије и способност раста, представљају потенцијалан ризик за људско здравље. Иако контроверзни агенси, нанобактерије дају нову перспективу за интерпретацију непотпуно разјашњеног процеса биоминерализације. Нанобактерије су описане у неколико хуманих болести и стања укључујући уролитијазу, калцификацију артерија и залистака, остеоартритис, карцином дојке и јајника и, занимљиво, већина ових поремећаја била је удружена са присуством псамоматозних телашаца (Ciftcioglu и сар 1999; Jones и сар, 2009; Miller и сар, 2004; Tsurumoto и сар, 2008).

У ћелијској култури и *in vivo*, нанобактерије развијају карактеристичан игличасти заштитни зид од калцијум апатита, који окружује лакунарну биосферу организма. У

култури се око њих развијају концентричне, калцификоване структуре, односно псамоматозна телашца (Kajander и сар, 2006; Cisar и сар, 2000). Према новим хипотезама, нанобактерије би могле бити сачињене од прионидног протеина са само-склапајућим и само-пропагирајућим способностима чији је раст удружен са стварањем псамоматозних телашца (Aguzzi и сар, 2009).

Недавно је описана патолошка калцификација плаценте удружена са нанобактеријама. Електронмикроскопски у плаценти су детектована телашца величине 160 nm, која не садрже калцијум и углавном представљају екстрацелуларне испреплетене фибриларне структуре, и 500 nm велика калцификована телашца, којима је била посута базална мембрана синциотиотрофобласта. Агрегати у које су биле организоване калцификоване нанобактерије били су налик минијатурним псамоматозним телашцима. Присуство депозита калцијума у језгру и периферној љусци ових телашца документовано је електронспектроскопским снимањем. Велика телашца су коалесцирала и формирала типичне, ламелиране псамоматозне калцификације, које су биле широко распрострањене у базалној ламини (Pasquinelli и сар, 2010).

Серозни папиларни цистаденокарцином јајника је у већој или мањој мери удружен са ПТ. У неким случајевима, број ПТ у тумору може бити толико велики да се због упечатљиве хистолошке слике назива и псамоматозним карциномом јајника. Hudelist и сарадници су детектовали нанобактеријске протеине имунохистохемијски и путем реверзна транскриптаза-полимеразне ланчане реакције (RT-PCR) у ПТ оваријалних аденокарцинома у 100% испитиваних случајева, док ни један од ПТ негативних карцинома није био позитиван. Поред тога, нанобактеријска mRNA нађена је у свим узорцима аденокарцинома који су садржали ПТ. На бази експерименталних доказа, они су закључили да нанобактеријска инфекција у малигном оваријалном ткиву доприноси процесу биоминерализације и стварања калцификованих депозита у форми ПТ (Hudelist и сар, 2004). Sedivy и Battistutti су у ПТ оваријалног аденокарцинома идентификовали нанобактеријске антигене путем имунохистохемије, а свој налаз потврдили електронмикроскопском и спектрометарском анализом. Присуство нанобактерија фокално су регистровали и у туморским ћелијама појединих суперфицијалних папила и у околини ПТ, док су сви остали делови тумора, околно очувано ткиво јајника, као и узорци цистаденокарцинома без ПТ били негативни. Код свих испитиваних случајева оваријалног карцинома са ПТ, аутори су у узорцима асцитне

течности успели да докажу присуство нанобактеријских протеина. Њихови резултати указали су на повезаност нанобактерија и налаза ПТ у серозном папиларном цистаденокарциному јајника и сугерисали могућу улогу нанобактерија у патогенези канцера асоцираних са ПТ (Sedivy и Battistutti, 2003).

### *1.8.3. Псамоматозна телашца у ненеопластичним стањима*

Присуство ПТ описано је у бенигним ткивима и ненеопластичним стањима, укључујући ендометријум, Хашимотов тироидитис, полинодозну струму и бенигне хиперпластичне нодулусе штитасте жлезде (Fiorella и сар, 1993; Dugan и сар, 1987; Herbold и сар, 1986). Дуган и колеге закључили су да се псамоматозна телашца могу видети у бенигним процесима који доводе до реактивне папиларне хиперплазије тироидног епитела, као што су нодозна струма или лимфоцитни тироидитис (Dugan и сар, 1987). Међутим, наглашено је да хиперпластичним папилама, иако су хистолошки веома сличне неопластичним папилама, недостаје централно стромално језгро, које има значајну морфофункционалну улогу у формирању прекурсорких структура ПТ. Хипотетички, ПТ у овим бенигним стањима могла би представљати остатке неопластичних папила које су некада постојале (Das и сар, 2009).

За пацијенте са аденоматозном струмом детекција калцификација у штитастој жлезди једна је од индикација за хируршко лечење. Клиничкопатолошки параметри и подаци о клиничком праћењу у студији која је анализирао 29 пацијената са појавом ПТ у штитастој жлезди удруженим са нетуморским стањима, открила је контралатерални или ипсилатерални тумор у 27 случајева, од којих је у већини (20 случајева) у питању био папиларни карцином (Hunt и сар, 2003). У складу са тим, аутори овог истраживања сугерисали су оправданост тироидектомије и пажљиви патохистолошки преглед целе штитасте жлезде у сваком случају где је регистровано присуство ПТ на биопсијским узорцима.

Поред присуства ПТ која уопште нису удружена са неопластичним процесом, описан је и налаз ПТ удружених са појавом тумора, али су телашца нађена ван туморске масе. Камерон и колеге описали су случај серозног карцинома утеруса са билатералним оваријалним метастазама који је био асоциран са широко распрострањеном

псамоматозном калцификацијом миометријума, цервикалне строме и леиомиома тела материце (Cameron и сар, 2004). Аутори су повезали екстензивно присуство ПТ са серозним карциномом, сугеришући да је стварање ПТ могућа последица локалне секреције неког фактора од стране туморских ћелија. С обзиром на то да су ПТ била просторно дистанцирана од главне туморске масе, закључили су да је мало извесно да су ПТ настала као последица некрозе и следствене дистрофијске калцификације папиларне неоплазме. Други приказ случаја представио је налаз бројних ПТ у цервикалном брису, киретажном материјалу ендометријума и перитонеалном лавату добијених од пацијенткиње код које је касније, у току клиничког праћења, откривен билатерални, гранични (borderline) серозни тумор. Аутори су успели да испрате морфолошки траг проласка ових ПТ и са њима удружених, цитолошки бенигних туморских ћелија кроз цео генитални тракт (Qazi и сар, 1988).

#### *1.8.4. Псамоматозна телашца у неопластичним стањима*

Псамоматозна телашца јављају се углавном у туморима чија је важна морфолошка карактеристика формирање папила. ПТ се најчешће могу видети у папиларном карциному штитасте жлезде, менингеому и папиларном серозном цистаденокарциному јајника (Kumar и сар, 2008; Das, 2009; Manjila и сар, 2013). У папиларном карциному штитасте жлезде ПТ се могу видети у 40-50% случајева када су у питању парафински пресеци, и у око трећине биопсијских узорака добијених фином игленом аспирацијом (Li Volsi, 1990; Das, 2004). Код менигеома ПТ су присутна у око 45% случајева, а у папиларном серозном цистаденокарциному оваријума у око 30% (Kumar и сар, 2008). ПТ се ретко могу видети и у другим неоплазмама, попут инсулинома, лактотропног аденома хипофизе, серозног папиларног аденома широког лигамента са граничним малигним потенцијалом, серозног карцинома материце, ендоцервикалног аденокарцинома, холангиоцелуларног карцинома, хромофобног карцинома бубрежних ћелија, псамоматозног карцинома перитонеума (Cameron и сар, 2004; Seltzer и сар, 1983; Cohen и сар, 2000; Piura и сар 2000).

Папиломи хороидног плексуса су бенигни тумори епитела ХП, који настају у можданим коморама и клинички се најчешће презентују хидроцефалусом. Често су удружени са калцификацијама, обично у форми ПТ, док је код двадесетак случајева

забележених у литератури описана права осификација (Manjila и сар, 2013). Слично радилошку презентацију папиломима показује и група интракранијалних лезија која се назива калцификујуће псеудонеоплазме неуроаксиса. Ове бенигне промене у кранијуму удружене су са калцификацијом, чији хистолошки степен варира од псамоматозних телашаца до праве костне метаплазије, са развојем зрелих коштаних гредица (Aiken и сар, 2009).

У штитастој жлезди, детекција микрокалцификација је високоспецифични знак малигних неопластичних процеса, с обзиром на то да се могу често детектовати у папиларном и медуларном карциному штитасте жлезде, док само 5% полинодозних струма и 3-4% аденома показује ову карактеристику (Triggiani, 2008). Псамоматозна телашца су посебно значајна и конзистентна карактеристика папиларног карцинома, где њихова појава има дијагностички значај (Carcangiu и сар, 1985; Руо и сар, 2013; Ваи и сар, 2009). ПТ се могу наћи код готово половине случајева папиларних карцинома, али и у околном, нормалном ткиву штитасте жлезде у скоро 50% случајева папиларног карцинома удружених са ПТ (Руо и сар, 2013).

Са појавом ПТ често је удружен и серозни папиларни цистаденокарцином јајника. У неким случајевима, овај карцином се презентује енормним бројем псамоматозних телашаца, те се због упечатљиве хистолошке слике и назива псамоматозним карциномом јајника. Слично томе, описује се и псамоматозна варијанта менингеома. Разлог зашто неки тумори садрже више, а неки мање ПТ још увек није разјашњен (Sedivy и сар, 2003). У погледу патогенезе, остеопонтин, протеин екстрацелуларног матрикса који је експримиран у бројним малигним туморима, увек је присутан када долази до формирања не-корпускуларних калцификованих депозита. Ови депозити се прогресивно трансформишу у ПТ, што је процес описан у серозном папиларном цистаденокарциному (Маки, 2000).

Псамоматозна калцификација описана је код немуцинозних аденокарцинома желуца код свега десетак случајева у литератури. Псамоматозна телашца се у виду концентричних, ламелираних калкосферита, величине од 5 до 100  $\mu\text{m}$ , уочавају у лумену канцерских жлезди, али и у туморској строми (Balestrieri и сар, 1997, Yildirim Erdođan и сар, 2011). Присуство ПТ регистровано је у 3.7% случајева цитолошких узорака садржаја серозних телесних шупљина у истраживању које је обухватило преко 3300 испитаника (Parwani и сар, 2004). Сви узорци плеуралне и перикардне течности у којима су нађена



ПТ били су малигни (карциноми штитасте жлезде, плућа и јајника), док је код асцитне течности присуство ПТ било удружено са малигном болешћу у око 55% случајева.

Папиларне неоплазме удружене са ПТ карактеришу се, углавном, индолентним клиничким током и повољном прогнозом. Бар делом повољан клинички ток псамоматозног карцинома јајника и перитонеума може се приписати дегенерацији и некрози туморских ћелија која је праћена настанком ПТ, што може деловати као својеврсна баријера против њиховог даљег ширења (Kuhn и сар, 1990). Иако се класично сматрају исходом дистрофијске калцификације, ПТ би могла представљати активни биолошки процес који укључује секрецију колагена и везикула окружених мембраном од стране неопластичних ћелија, чије слојевито слагање и калцификација резултује стварањем баријере за даље ширење неопластичних ћелија или чак доводи до њихове смрти (Das, 2009).



## 2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

- Да се на препаратима бојеним трихромном методом по Малорију одреде морфолошке карактеристике хуманог хороидног плексуса из све четири мождане коморе
- Да се детектују ПТ у хороидном плексусу на трихромно бојеним препаратима, и утврди њихова морфологија, као и локализација и дистрибуција
- Да се уочене морфолошке карактеристике самог хороидног плексуса и присутних ПТ повежу са годинама старости лица од којих су узорци добијени
- Да се морфометријском методом на трихромно бојеним препаратима одреде квантитативне особине хороидног плексуса (површинска густина хороидног плексуса, запреминска густина крвних судова), епителних ћелија хороидног плексуса (ареа, периметар, Феретов дијаметар, обликовани фактор, висина епитела), једара епителних ћелија (ареа, периметар, Феретов дијаметар, обликовани фактор, нуклео/цитоплазматски однос) и ПТ (укупна ареа ПТ у испитиваном случају, просечна ареа појединачних ПТ, периметар, Феретов дијаметар, обликовани фактор), у функцији старости
- Да се морфолошки анализира реакција структура хороидног плексуса на имунохистохемијске маркере у функцији животне доби
- Да се утврди дистрибуција имунопозитивности на испитиване маркере у структурама хороидног плексуса
- Да се не препаратима добијеним методама имунохистохемијског бојења, квантификује присуство ПТ са позитивном, односно негативном реакцијом на испитиване маркере
- Да се статистичким методама, пронађе веза између година живота и реакције ПТ на имунохистохемијске маркере



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Материјал

Истраживање је спроведено на материјалу узетом са 24 кадавера, по 12 оба пола, током рутинских аутопсија на Институту за судску медицину у Нишу. Само истраживање је одобрено од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Старост кадавера је варијала од 35 до 84 године (просечна старост  $61,5 \pm 14,2$  година). Увидом у доступну медицинску документацију као и на основу хетероanamнестичких података потврђено је да ниједан од кадавера укључених у студију није имао за живота дијагностиковану болест нервног система, нити су током аутопсије уочене абнормалности или оштећења мозга. Временски период од тренутка смрти до узимања узорка није био дужи од 12 часова. Узорци ткива хороидног плексуса узети су из обе бочне, треће и четврте мождане коморе.

#### 3.2. Методе

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

##### *3.2.1. Анатомска микродисекција*

Поступак за извођење микродисекције мозга ради узорковања хороидног плексуса за потребе хистолошке обраде био је следећи: хоризонталним резом у нивоу

можданих педункула средњег мозга одвајан је предњи мозак од задњег. Затим је дисекционим ножем рађен хоризонтални рез непосредно испод жуљевитог тела целом дужином великог мозга од фронталног до окципиталног пола. Пинцетом су одвајани хороидни плексуси бочних можданих комора од можданог ткива. Са десне и леве хороидне теније (траке) у нивоу медуларне стрије таламуса одвајани су хороидни плексуси треће мождане коморе. Потом је прављен вертикалан рез у нивоу вермиса између хемисфера малог мозга, и по одвајању десне и леве половине малог мозга хируршким маказама је одвајан хороидни плексус четврте мождане коморе заједно, у блоку, са делом можданог стабла за који је причвршћен. Након фиксације у 10% пуферисаном формалину, тај део можданог ткива уклањан је приликом обраде ткива која је претходила калупљењу.

### *3.2.2. Хистолошка обрада ткива*

Добијени узорци су фиксирани у 10% пуферисаном формалину не дуже од 24 часа. Након тога узорци су подвргнути процесу декалцинације употребом 18,6% раствора Na-EDTA у трајању од 24 часа. Потом је ткивни материјал хороидних плексуса прво подвргнут рутинској, аутоматизованој обради до парафинских калупа, уз употребу дехидратационе линије усходних концентрација етанола, просветљавања ксилолом и инфилтрације полимерним парафинским воском на Институту за судску медицину у Нишу, а затим калупљени у парафинске блокове. Накнадно су одговарајућим техникама бојени исечци дебљине 4 $\mu$ m. Хистолошка анализа је обухватала хистохемијски и имунохистохемијски део. Након хисто- или имунохистохемијског бојења, препарати су морфолошки анализирани уз помоћ светлосног микроскопа (Leica DM2500) на Клиници за дечије интерне болести, Клиничког центра у Нишу. За морфометријску анализу, насумично су изабрана по 10 видна поља под увећањима од 100x и 400x, а затим фотографисана дигиталном камером (Leica DFC420) монтираном на трећи окулар микроскопа, у резолуцији 2592x1944 пиксела.

### 3.2.2.1. Хистохемијске методе

Хистохемијска анализа је подразумевала бојење препарата трихромном методом модификованом по Малорију (Mallory). У ту сврху ткивни пресеци су прво подвргнути процесу депарафинације са две измене ксилола од по 5 минута. Након тога ткивни исечци су рехидрирани кроз серију алкохола (етанол) опадајуће концентрације (100%, 96%, 75%) у трајању од по 5 минута и преливени дестилованом водом. Потом су ткивни пресеци бојени 5 минута у Мајеровом (Mayer) хематоксилину, а затим диферентовани у чесменој води (до 2 минута) и испирани у дестилованој води. Следило је испирање у 96% етанолу, укупно 10 потапања. У следећем кораку ткивни исечци су контрабојени еозином у трајању од 1,5 минута. Ткивни исечци су затим дехидрирани кроз серије етанола са растућом концентрацијом (96%, 100%) у трајању од по 5 минута, просветљени у ксилолу са две измене од по 5 мин и монтирани коришћењем DPX-а и покровних љуспица. На овако добијеним препаратима, односно дигиталним фотографијама, извршена је морфолошка анализа структура хороидног плексуса, као и морфометријска анализа хороидног плексуса и припадајућих структура (крвни судови, епител, ПТ).

### 3.2.2.2. Имунохистохемијске методе

Експресија специфичних протеина у ткиву одређивана је имунохистохемијским бојењем. На том методом бојеним пресецима, утврђивана је реакција ПТ на имунохистохемијске маркере. Затим су морфометријски анализирана ПТ са или без одговарајуће реакције. Осим тога, морфолошки су анализирани и остале структуре са позитивном реакцијом на имунохистохемијске маркере у функцији старости. За имунохистохемијску анализу коришћено је ткиво хороидних плексуса обе бочне коморе са репрезентативних 15 кадавера.

#### *Детекција остеопонтин и остеокалцина*

За детекцију остеопонтин и остеокалцина коришћена су следећа поликлонска антитела: анти-остеопонтин (ab8448, Abscam, Кембриџ, САД) и анти-остеокалцин (ab93876, Abscam, Кембриџ, САД). Парафински пресеци ткива су пре имунохистохемијског бојења депарафинисани и урађено је откривање антигена.

Пресеци ткива су инкубирани у воденом купатилу на 98°C, у раствору *EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH* (Dako) који садржи Tris/EDTA, pH 9, како би се извршило откривање антигена. Након тога, пресеци ткива су испирани у одговарајућем пуферу (PBS). За детекцију специфичног везивања антитела коришћен је *Novolink™ Polymer Detection System* (RE7290-K, Leica Biosystems) према упутству произвођача. Укратко, након откривања антигена и испирања ткива, активност ендogene пероксидазе је блокирана применом *Peroxidase Block* раствора у трајању од 5 минута. Затим је ткиво испирано и инкубирано са раствором *Protein Block* у трајању од 5 минута како би се спречило неспецифично бојење. Пресеци ткива су затим инкубирани са примарним антителима у трајању од 60 минута на 37°C. Анти-остеопонтин антитело је коришћено у разблажењу 1:500, а анти-остеокалцин у разблажењу 1:200. Разблажења антитела прављена су у пуферу. Након завршене инкубације и испирања ткива у пуферу, ткиво је инкубирано са секундарним антителом *Anti-rabbit Poly-HRP-IgG (<25µg/mL)* која садржи 10% (v/v) серума у Tris пуферу, у трајању од 30 минута. Након испирања, пресеци ткива су инкубирани са DAB (3,3'-диаминобензидин) субстратом и хромогеном у трајању од 5 минута како би се извршила визуелизација протеина обележених примарним антителима. Пресеци ткива су затим контрастирани бојењем са Мауер-овим хематоксилином. Након испирања у води, пресеци ткива су дехидратисани кроз серију растућих концентрација алкохола и покривени. Као негативна контрола коришћени су пресеци ткива третиран под истим условима, али са изостављеном инкубацијом са примарним антителом, како би се искључило неспецифично везивање секундарног антитела.

#### *Детекција CD44 и CD68 маркера*

За детекцију CD44 и CD68 маркера коришћена су следећа моноклонска антитела: хумано анти-CD44, clone DF1485 (M7082, Dako), и хумано анти-CD68 антитело, clone PG-M1 (IR613, Dako). Парафински пресеци ткива су пре имунохистохемијског бојења депарафинисани и рехидратисани. Откривање антигена је урађено тако што су пресеци ткива инкубирани у цитратном пуферу у воденом купатилу на 98°C у трајању од 20 минута. Након тога, пресеци ткива су испирани у одговарајућем пуферу (PBS). За детекцију специфичног везивања антитела коришћен је *EnVision Flex System* (K8024, Dako) према упутству произвођача. Пресеци ткива су инкубирани са примарним антителима преко ноћи на +4°C. Антитело анти-CD44 је примењено у разблажењу 1:50



(у Tris пуферу) док је антителио анти-CD68 било већ разблажено од стране произвођача (ready-to-use). Након испирања, визуелизација специфичних маркера је извршена тако што су пресеци ткива инкубирани са раствором који садржи EnVision™ FLEX Substrate Buffer и EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen у трајању од 10 минута. Пресеци ткива су затим контрастирани бојењем са Мауер-овим хематоксилином. Након испирања у води, пресеци ткива су дехидратисани кроз серију растућих концентрација алкохола и покривени. Као негативна контрола коришћени су пресеци ткива третирани под истим условима, али са изостављеном инкубацијом са примарним антителиом, како би се искључило неспецифично везивање секундарног антителиа.

### 3.2.3. Морфометријска анализа

Морфометријска анализа дигиталних фотографија је извршена уз помоћ ImageJ (верзија 1.49, National Institutes of Health, САД) софтвера за обраду и анализу слика. Све фотографије су за потребе коришћених алата превођене 24-битни RGB формат. Пре извођења саме анализе, било је неопходно извршити спацијалну калибрацију система уз помоћ објектног микрометра (1:100) сликаног под увећањем од 100x, односно 400x, у зависности од увећања под којим је фотографисање извршено.

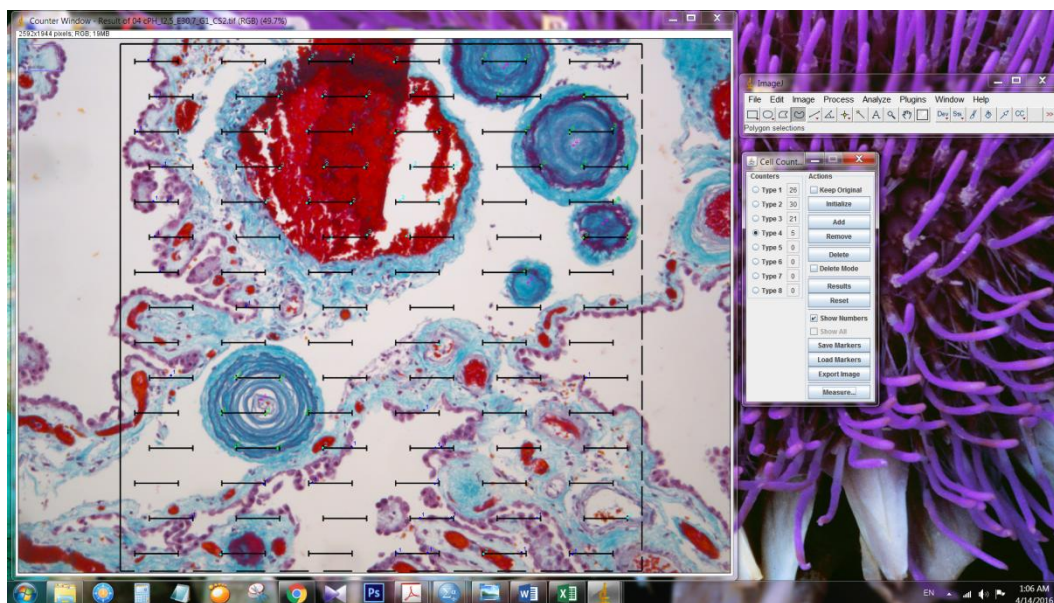
#### 3.2.3.1. Стереолошка анализа хистохемијских препарата

За овај део анализе коришћен је мултифункционални тестни систем M168 ( $d=82,0\mu\text{m}$ ,  $Lt=6888,1\mu\text{m}$ ,  $At=978365,9\mu\text{m}^2$ ,  $a=5823,6\mu\text{m}^2$ ). Уз помоћ алата за бројање ћелија (Cell counter) ручно су обележаване и бројане тачке тестног система (Слика 1) које су погађале сам хороидни плексус (Pt), крвне судове (Pbv) и ПТ (Ppb). Осим тога бројан је и број пресека тестног система са спољашњом контуром епитела хороидног плексуса (Ie), као и укупан број ПТ унутар тестног система (Npb).

На основу добијених вредности израчунати су следећи морфометријски параметри (Russ и сар, 2012):

- површинска густина хороидног плексуса (1/мм) –  $SV_{ch} = \frac{2 \times Ie}{Lt}$
- запреминска густина крвних судова (1/1) –  $VD_{bv} = \frac{Pbv \times 100}{Pt}$

- нумеричка густина ПТ ( $1/\text{мм}^3$ ) –  $ND_{pb} = \frac{N_{pb}}{P_t \times a \times D_{pb}}$
- запреминска густина ПТ ( $1/1$ ) –  $VD_{pb} = \frac{P_{pb} \times 100}{P_t}$



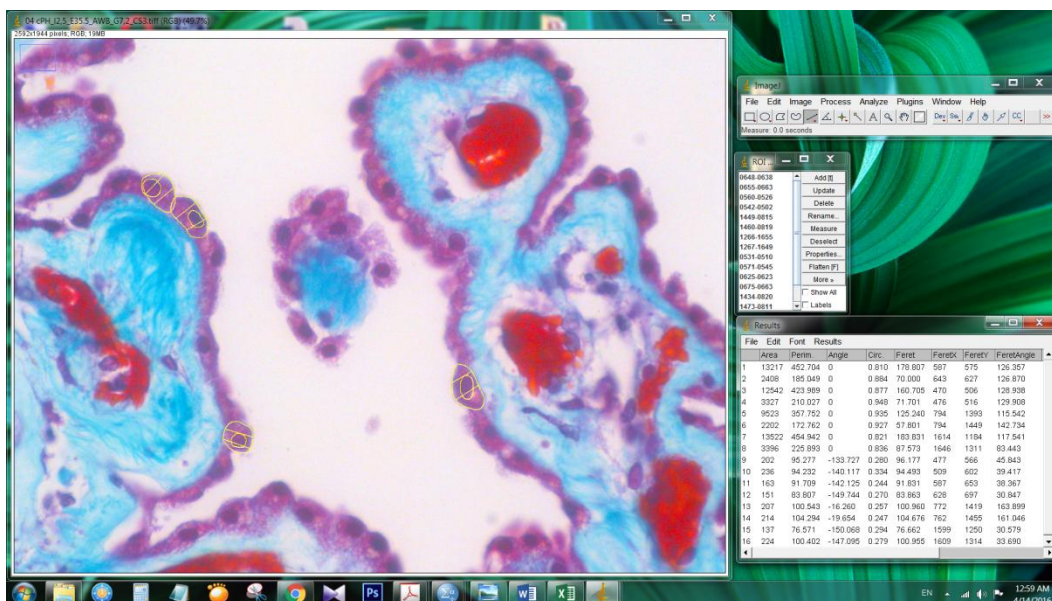
Слика 1. Стереолошка анализа алатом за бројање ћелија

### 3.2.3.2. Астереолошка анализа епитела хороидног плексуса

Методом астереологије на фотографијама сниманим под увећањем од 400x, анализиран је епител хороидног плексуса, односно његова висина, ћелије и једра епителних ћелија. Уз помоћ алата ROI manager (Слика 2), слободоручном селекцијом је обележавано по 10 насумичних епителних ћелија, као и припадајућа једра, на сваком видном пољу. Одабиром у менију за анализу, за сваку ћелију односно једро, израчунавана је ареа ( $A_c$ ,  $A_n$ ), периметар ( $B_c$ ,  $B_n$ ) и Феретов дијаметар ( $D_c$ ,  $D_n$ ).

Ареа, изражена у квадратним микрометрима, представља површину обележене структуре на препарату. Периметар ( $\mu\text{m}$ ) је, заправо морфометријски параметар испитиване структуре који одговара обиму испитиване структуре, у овом случају епителне ћелије и њеног једра. Феретов дијаметар ( $\mu\text{m}$ ) је највећи пречник обележене структуре који се израчунава на основу растојања између две најдудаљеније међусобно паралелне тангенте. Однос арее и квадрата периметра представља обликовани фактор ( $A/B_c$ ,  $A/B_n$ ) који указује на правилност облика саме структуре (округле структуре имају

вредности ближе 1). На основу араа епителне ћелије и њеног једра, израчунаван је нуклео/цитоплазматски однос (N/C).



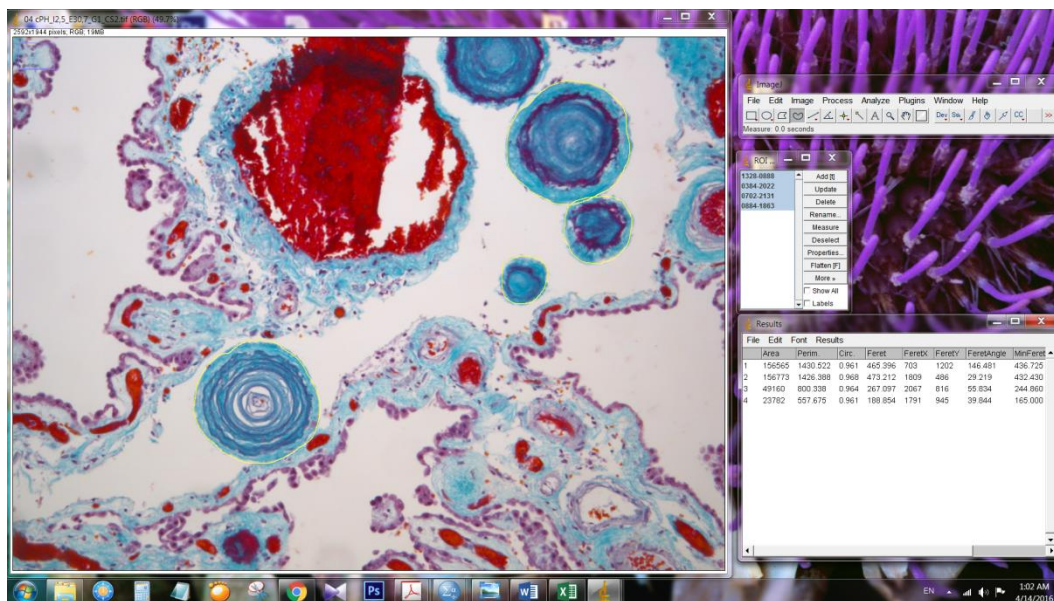
Слика 2. Астеролошка анализа епитела хороидног плексуса

Уз помоћ истог алата ручно је мерена висина епитела, при чему су у свакој од 10 мерених епителних ћелија, обележавана два различита растојања између апикалног и базолатералног пола.

#### *Астереолошка анализа псамоматозних телашца*

На претходно описан начин, анализирана су сва псамоматозна телашца на фотографијама (Слика 3). За свако од ПТ добијени су следећи морфометријски параметри: араа (Арб), периметар (Врб), Феретов дијаметар (Дрб) и обликовани фактор (А/Врб). Осим тога, за сваки од случаја одређивана је и укупна араа свих ПТ (ТАрб).

На имунохистохемијски бојеним препаратима, засебно су анализирана ПТ са позитивном и негативном реакцијом на имунохистохемијски маркер. Осим што су одреживани морфометријски параметри (укупна араа ПТ, араа појединачних ПТ, периметар и Феретов дијаметар), бројани су ПТ са позитивном и негативном реакцијом, те је рачунаван њихов процентуални удео. Позитивном реакцијом је сматрана пребојеност више од 50% површине ПТ.



Слика 3. Астереолошка анализа псамотозних телаца

### 3.2.4. Статистичке методе

Анализа добијених података је урађена уз помоћ Статистичког пакета за социјалне науке (Statistical Package for Social Sciences (SPSS), верзија 16.0; Чикаго, САД). Добијени подаци су представљени у виду просечне вредности са стандардном девијацијом, односно медијаном и интерквartilном разликом. Осим табеларно, морфометријски подаци су приказани и графички. Нормалност дистрибуције је одређивана на основу неколико особина расподеле (асиметрија, спљоштеност, присуство екстремних вредности, Шапиро-Вилков тест). За међусобно поређење група података коришћени су параметријски (Студентов т-тест, АНОВА) и непараметријски тестови (Ман-Витнијев У-тест, Крускал-Валисова АНОВА, Џонкхир-Терпстра тест, Мозесов медијана тест) у зависности од нормалности расподеле података. Повезаност између варијабли је утврђивана на основу Пирсоновог или Спирмановог коефицијента корелације, односно  $\chi^2$ -тестом независности. Методом стандардне вишеструке регресије формиран су модели предвиђања промена зависне варијабле на основу више независних. Статистичка значајност је одређивана на нивоу  $p < 0,05$ .

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Морфолошка анализа

#### 4.1.1. Хистохемијска анализа

Узорци ткива хороидних плексуса су анализирани подељени у три старосне групе: до 50 година старости, 51-69 година и преко 70 година старости. Осим тога, сагледаване се у и разлике између хороидних плексуса исте старосне групе, али различите локализације, с обзиром да су узорци узимани из све четири мождане коморе.

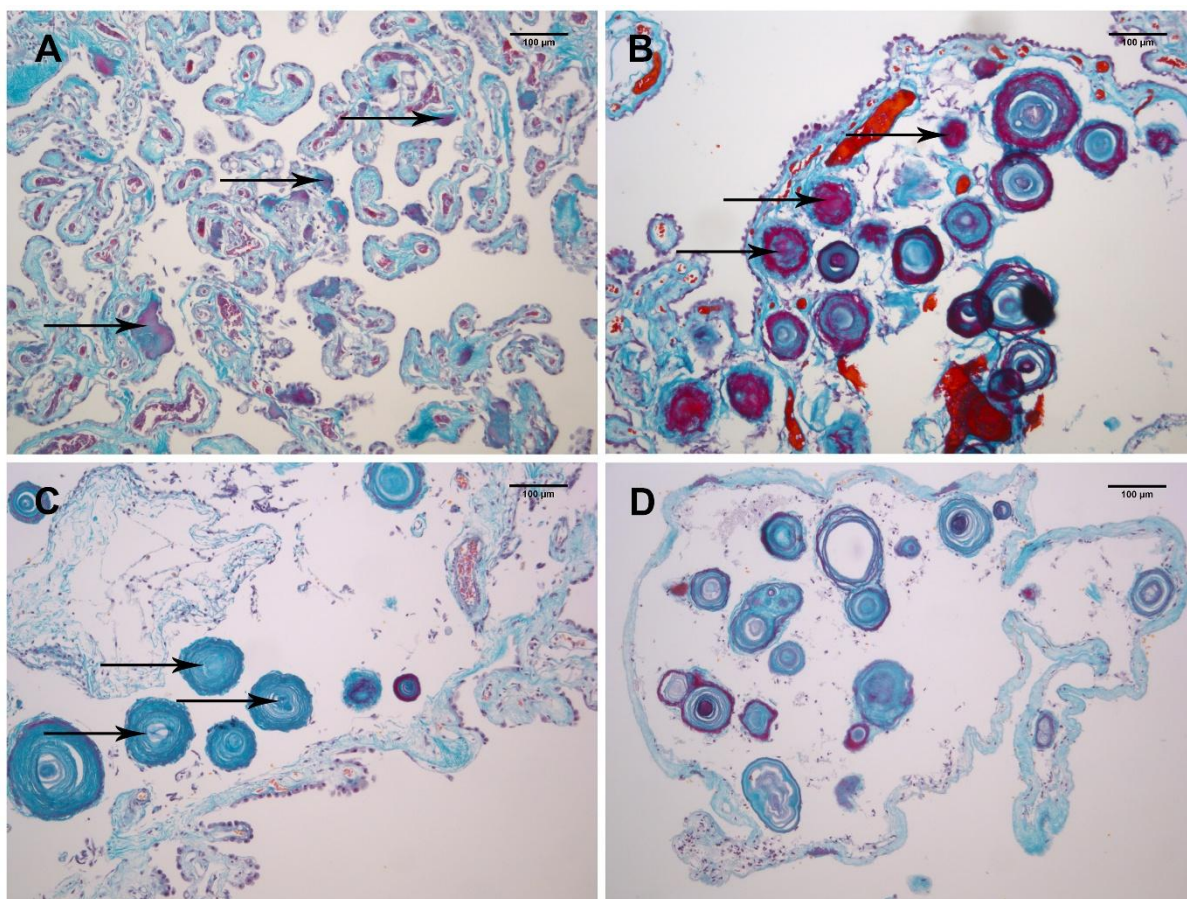
Најмлађа старосна група се карактерише израженом разгранатошћу хороидног плексуса. Епител чине ћелије коцкастог облика са централно или базално постављеним хетерохроматским једром. У појединим ћелијама се могу уочити крупне вакуоле које потискују и деформишу једро. Местимично се уочавају и спљоштене ћелије вретенастог изгледа, или куполасте ћелије које површини епитела дају зупчасту контуру. У његовој основи су присутни већи крвни судови, артерије и артериоле, док у дисталним крајевима доминирају капилари. Целуларност строме је веома изражена. ПТ су појединачно дистрибуирана у строми хороидних плексуса, најчешће у близини већих крвних судова. Велики је број незрелих ПТ амофног средишта, у којима се не уочавају ламеле или се само види периферни љубичасто пребојени прстенови. Конгломерати више ПТ су ретки, и виђају се искључиво у цистичним структурама које су такође ретке. Око цистичних структура се налази густо везивно ткиво, а непосредно испод њега ћелијске инфилтрације. У појединим узорцима из треће, а нарочито четврте мождане коморе није било уопште ПТ. Међутим, у дисталним деловима хороидних чупица се могу уочити места на којима ће доћи до стварања ПТ. Она се репрезентују као густо збијена

концентрична колагена влакна, или тамно љубичасто пребојене мрље, које одговарају накупинама калцијума, око којих се збија везивно ткиво.

У средњој старосној групи, разгранатост хороидног плексуса је још увек добро очувана. У епителу још увек доминирају коцкасте ћелије са хетерохроматичним једром, али се нешто чешће уочава дисконтинуитет епитела са проширеним међућелијским просторима, као и епител тестерастог изгледа. За разлику од 1. старосне групе где су се уочавале интрацелуларне појединачне веће вакуоле, у овој старосној групи поједине групе ћелије имају цитоплазму пенушаваог изгледа услед присуства великог броја малих вакуола, без значајног утицаја на морфологију једра. Целуларност строме је мања него у претходно описаној, млађој старосној групи. Калцификати су бројнији. Међу ПТ доминирају зрела ПТ карактеристичне ламеларне структуре од којих поједина достижу знатне димензије. Као и у млађој животној доби локализована су најчешће у основи хороидног плексуса у близини већих крвних судова, али у већим групама. Цистичне формације су ретке. Све описане промене су мање изражене у хороидним плексусима 3. и 4. мождане коморе. Епител је узнатно већој мери очуване структуре, а ПТ су ређе присутна.

У најстаријој старосној групи је очигледно присутна атрогија хороидног плексуса, са смањеном разгранатошћу вилуса. Епител у појединим деловима поприма зупчаст изглед услед присуства куполастих ћелија, што повећава висину самог епитела, са повећањем простора између епителних ћелија. Међутим, присутан је и епител нормалног изгледа са централно или базално постављеним округлим еухроматичним једрима. Заравњен спљоштен епител, чак са ћелијама вретенастог изгледа и преиферно потиснутим једром, је присутан у основи хороидног плексуса. У неким узорцима се могу наћи огромне епителне ћелије са огромним једрима, скоро округлог облика, чак без видљивих вакуола или неких инклузија које доводе до оваквог изгледа ћелија. У дисталним деловима су присутни централно постављени капилари, док се у проксималним деловима чупица могу уопити и већи крвни судови типа артериола попречно или уздужно пресечени. Присутне су многобројне љубичасто пребојене калцификације које су највероватније места формирања нових ПТ. Најчешће су локализоване испод самог епитела, с тим што су оне које су дубље у строми ХП обавијене густом мрежом концентричних колагених влакана, мада су присуне и концентричне структуре од колагених влакана без калцификација у средишту. Између

већих крвних судова и епитела је густо збијено везивно ткиво. Незрела ПТ са аморфним љубичастим садржајем у средишту су најчешће локализована у дисталним деловима вилуса. У проксималним деловима су видљиве цисте са зрелим збијеним ПТ ламеларне грађе. Периферне ламеле су тамније љубичасто пребојене, док су централно плаве пребојености, понегде аморфне структуре. У цистама са великим бројем ПТ доминирају ПТ малог дијаметра. У везивном ткиву око цисти се могу уочити многобројне фибробластне ћелије. ПТ су присутна и ван цистичних творевина, најчешће у близини великих крвних судова. Ови ПТ су великог пречника, правилног округлог облика, с тим што често долази до фузије два или више ПТ са стварањем нових ламела око оваквих агрегата. У трећој, а нарочито четвртој можданој комори атрофија вилус хороидних плекуса је мање изражена. ПТ су ређи и појединачно локализовани у строми, мењих димензија. Назубљеност епитела са увећаним интерцелуларним просторима се мање приметна.

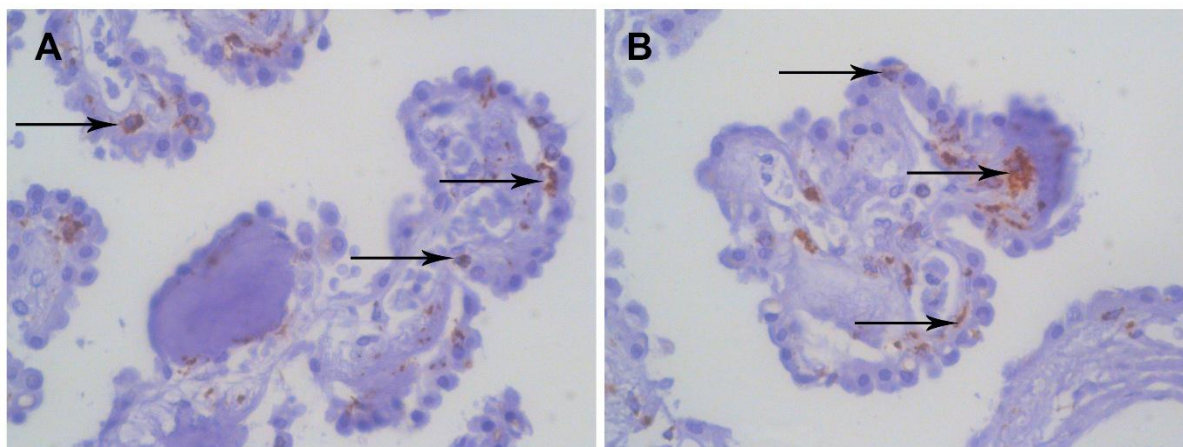


Слика 4. Псамоматозна телашица у хороидном плексусу (трихромно бојење по Малорију, 100x): А. аморфне калцификације; В. незрела псамоматозна телашица; С. зрела ламеларна псамоматозна телашица; D. циста са псамоматозним телашицама

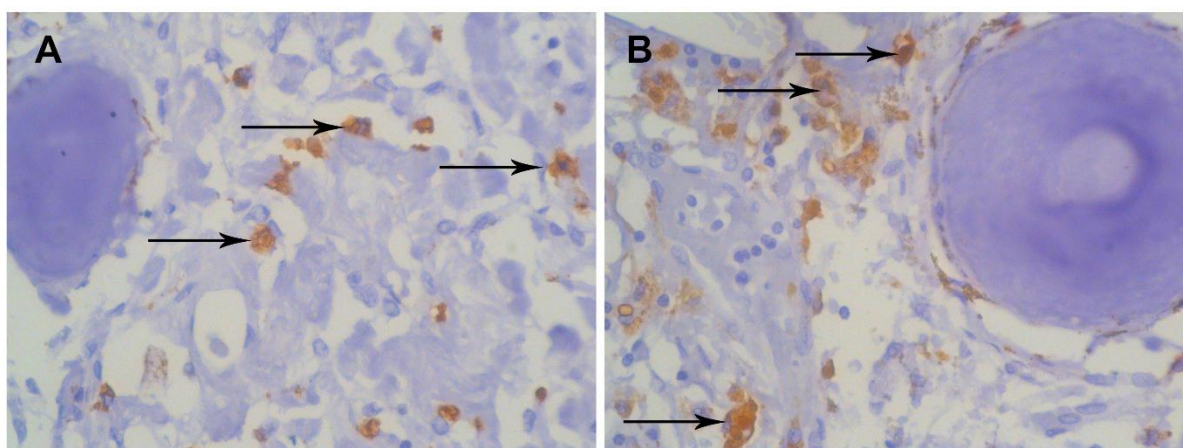
#### 4.1.2. Имунохистохемијска анализа

##### 4.1.2.1. Имунохистохемијска анализа експресије CD68

CD68 имунопозитивност присутна је у строми чупица хороидног плексуса, где се уочава у цитоплазми овалних и издужених ћелија са крупним еухроматичним једром, превасходно локализованих испод епитела хороидног плексуса и око крвних судова, а у мањој мери расутих по стоми чупице (Слика 5). Епителне ћелије, ендотелне ћелије, као и ћелије медије крвних судова се не боје на антиген CD68. Такође, највећи број ћелија фибробластичне морфологије у строми чупица хороидног плексуса не показују позитивност на антиген CD68.



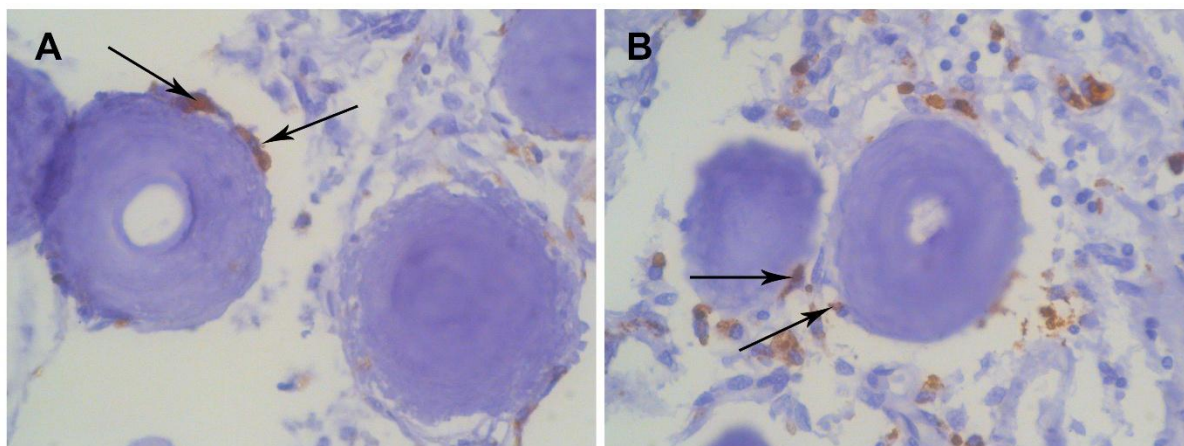
Слика 5. Субепителна локализација CD68 имунореактивних ћелија (CD68, 400x)



Слика 6. Стромална локализација CD68 имунореактивних ћелија (CD68, 400x)



Сама ПТ не експримирају имунореактивност на CD68. Међутим, CD68 позитивне ћелије уочавају се у непосредној близини ПТ. Густина CD68 имунореактивних ћелија расте градијски од најудаљенијих до делова строме који непосредно окружују телашца. Поред тога, примећено је да неке од CD68 позитивних ћелија додирују површину ПТ, док су поједине екстендиране преко саме површине калцификата (Слике 6-7).

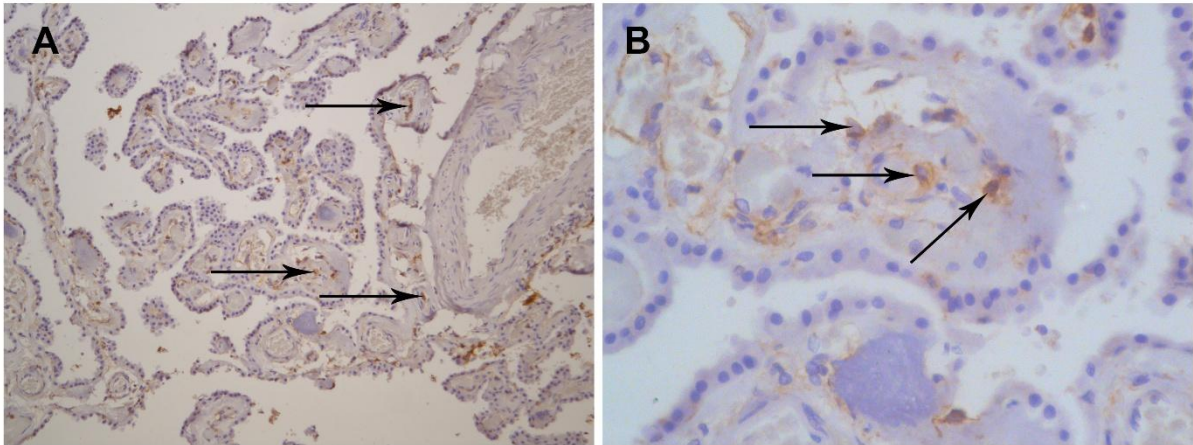


Слика 7. CD68 имунореактивне ћелије на површини псамоматозних телашца (CD68, 400x)

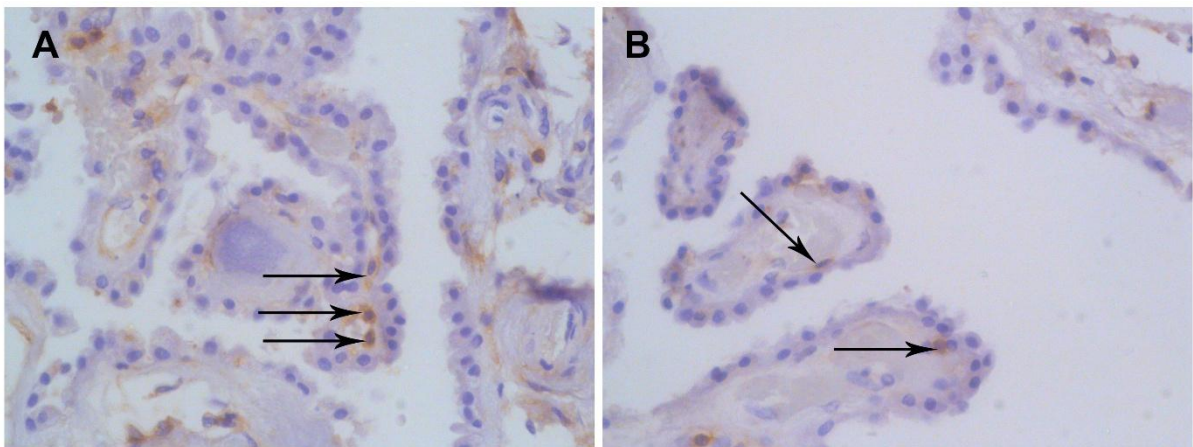
#### 4.1.2.2. Имунохистохемијска анализа експресије CD44

Експресија CD44 забележена је у виду ситнозрнастог, гранулираног цитоплазматског имунопребојавања појединачних ћелија строме вилуса ХП. Морфологија ћелија чија се цитоплазма маркирала на CD44 обухватала је фенотипски спектар од крупних овалних ћелија са еухроматичним једрима до издужених, вретенастих ћелија, цилиндрично елонгираних једара, које су одговарале ћелијама мезенхимног изгледа, највероватније фибробластима и фиброцитима строме.

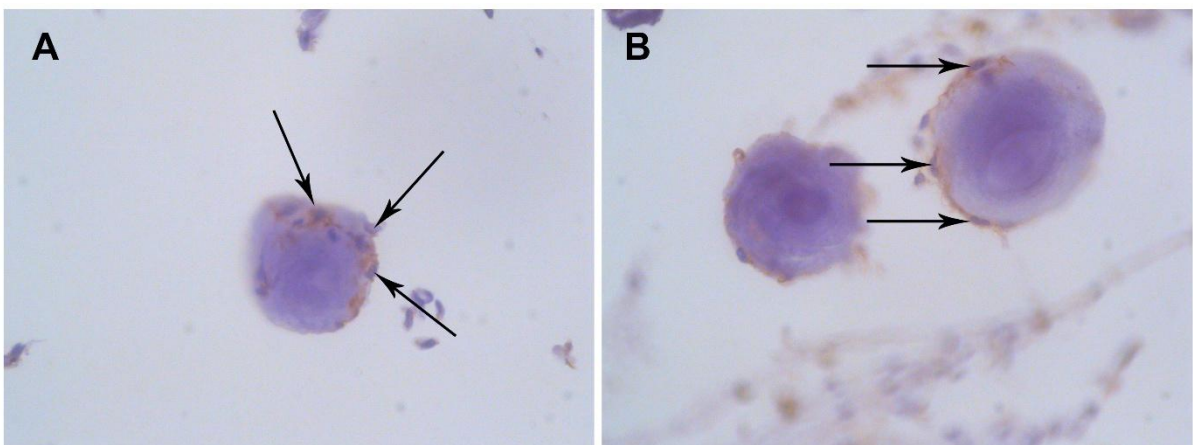
Ћелије са CD44 позитивном имуноекспресијом биле су највећим делом утопљене у везивоткивни матрикс периваскуларне строме (Слика 8), која чини срж хороидних чупица. Поједине CD44 имунореактивне ћелије биле су лоциране субепително, у непосредној близини базалне ламине епитела ХП (Слика 9).



Слика 8. Стромална локализација CD44 имунореактивних ћелија (A. CD44, 100x; B. CD44, 400x)



Слика 9. Субепителна локализација CD44 имунореактивних ћелија (CD44, 400x)



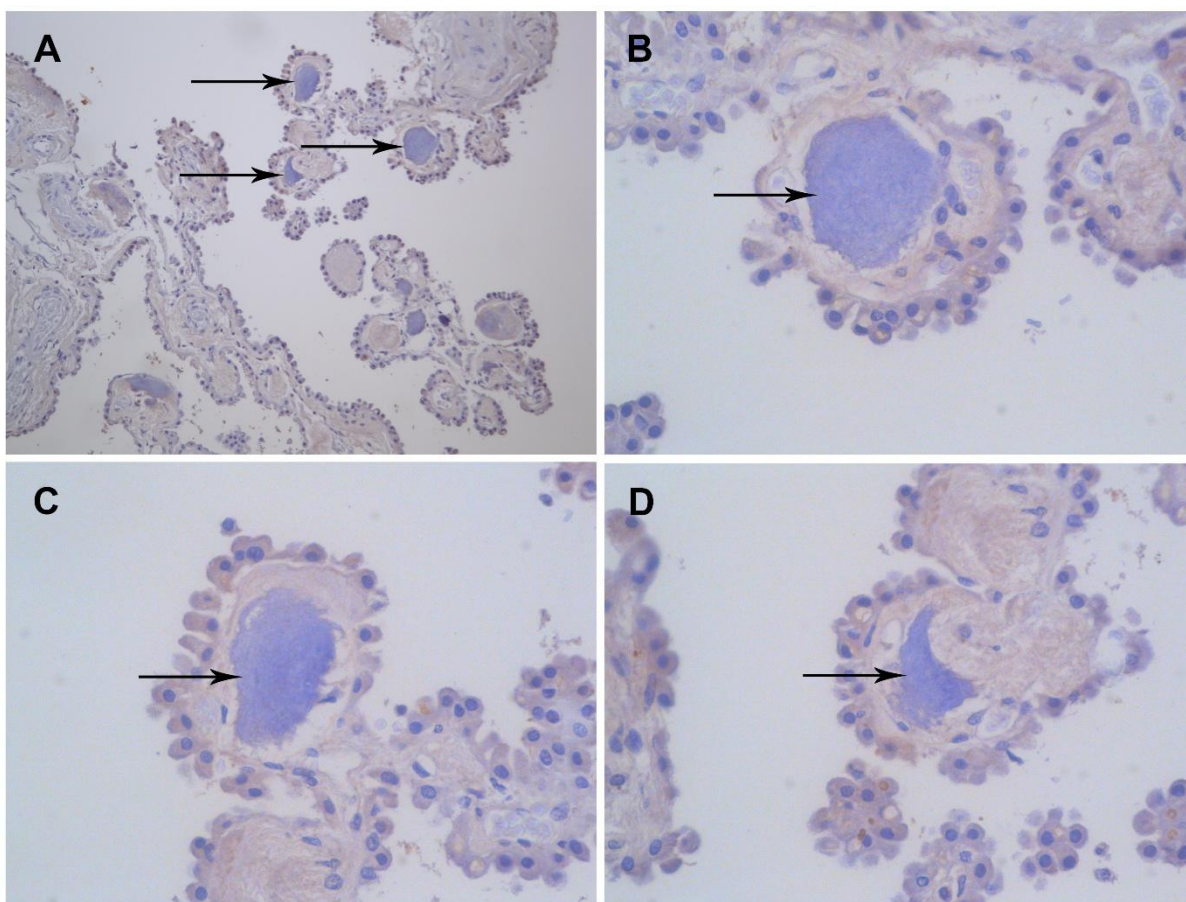
Слика 10. CD44 имунореактивне ћелије на површини псамоматозних телаца (CD44, 400x)

Уочено је да су на површини појединих ПТ биле присутне љуспасте, вретенасте CD44 позитивне ћелије. Наиме, на малом броју ПТ запажено је да ћелије позитивне на CD44 практично леже на површини ПТ, у виду целуларног венца који окружује сферу телашца (Слика 10). Поред тога, у строми непосредне околине ПТ запажена је повећана густина ћелија имунопозитивних на CD44.

Остали ћелијски типови, као и компоненте екстрацелуларног матрикса су CD44 имунонегативне.

#### 4.1.2.3. Имунохистохемијска анализа експресије остеопонтин у псамоматозним телашцима

Имунопозитивност на остеопонтин није забележена у амилоидним депозитима, аморфним калцификацијама (Слика 11).

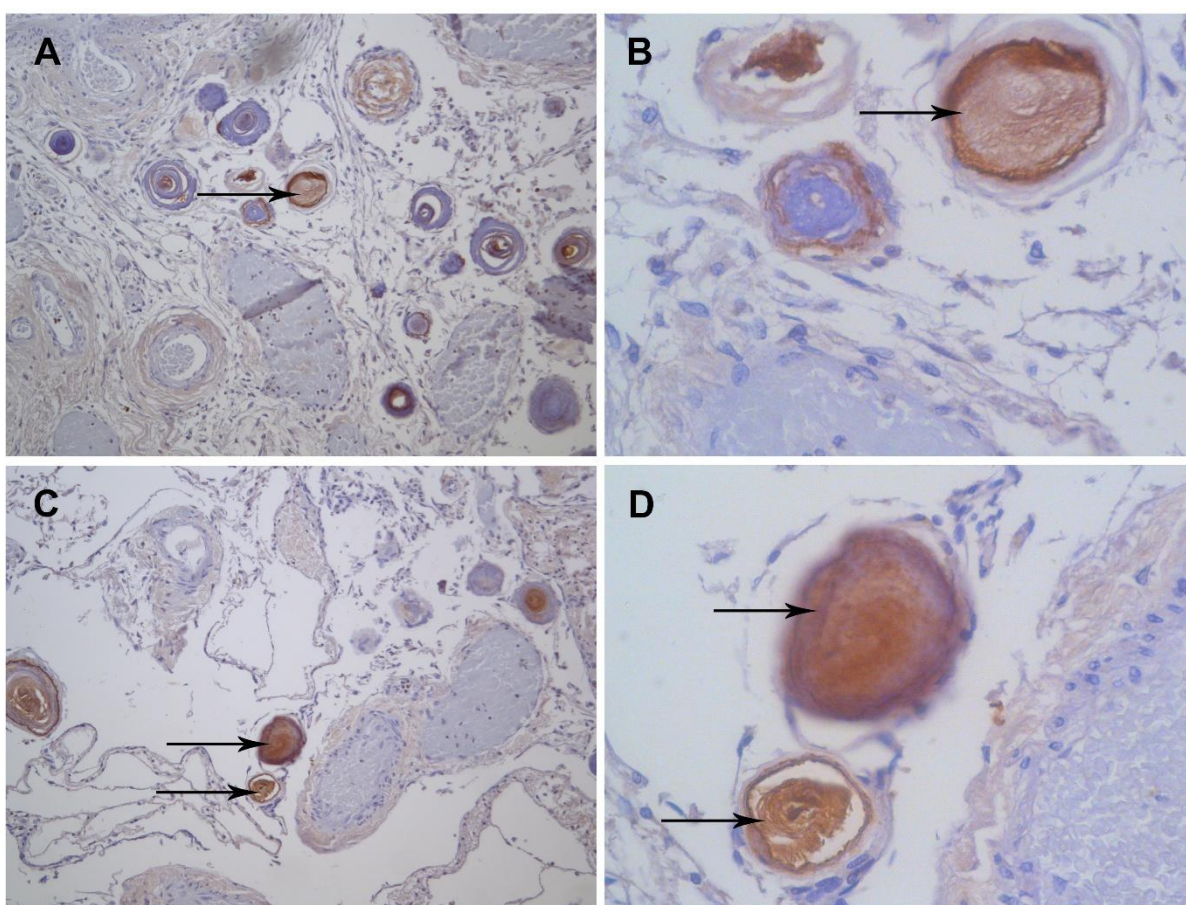


Слика 11. Имунонегативне аморфне калцификације на остеопонтин (А. остеопонтин, 100x; В-Д. остеопонтин, 400x)

Зреле и незреле форме псамоматозних телаца у највећем броју случајева показивале су позитивност на остеопонтин.

Експресија остеопонтинина била је присутна у свим анализираним ПТ у узорцима ХП леве и десне бочне мождане коморе. Односно, степен експресије остеопонтинина у незрелим и зрелим, ламелираним формама ПТ износио је преко 90%. Ниво експресије у ПТ је, међутим, показивао велику хетерогеност.

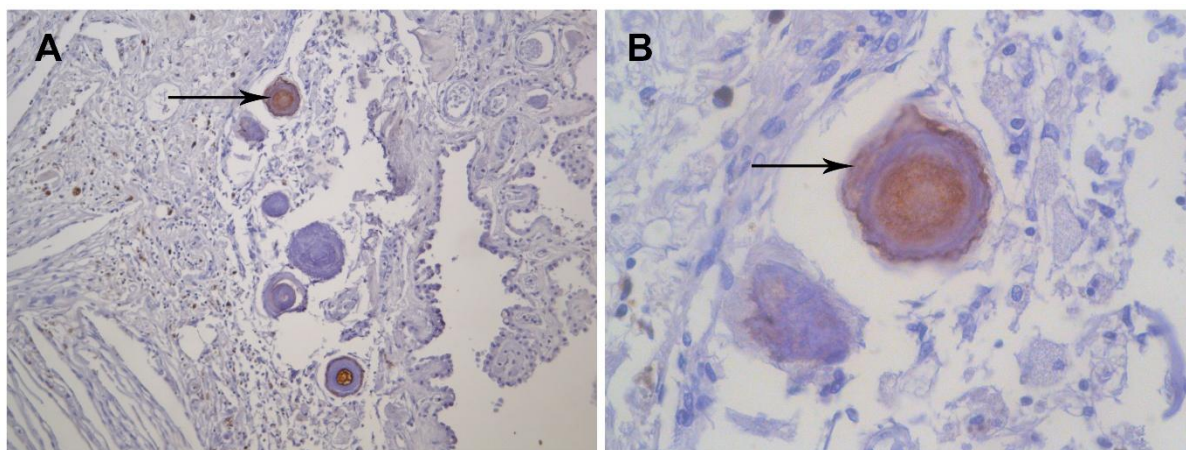
Наиме, ПТ нису показивала униформан начин експресије, већ је уочено неколико образаца имунопозитивности у незрелим и зрелим ПТ.



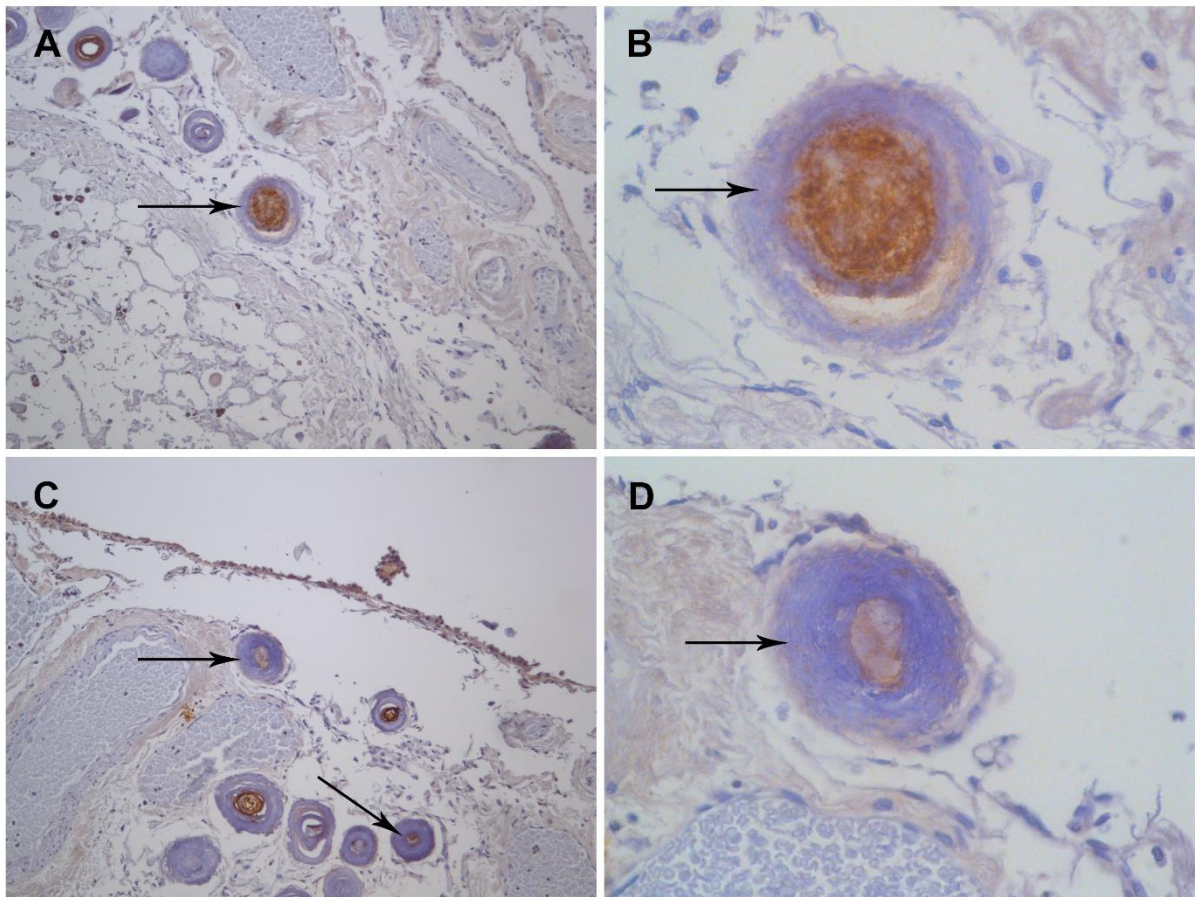
Слика 12. Имунопозитивна незрела ПТ: А. хомогено пребојена незрела ПТ аморфног изгледа (остеопонтин, 100x); В. фибриларна шара имунопозитивног аморфног језгра ПТ (остеопонтин, 400x); С. Имунопозитивна незрела ПТ са нејасно диферентованим љуспастим словјевима на површини или без експресије остеопонтинина на површини (остеопонтин, 100x); Д. Имунопозитивна незрела ПТ са нејасно диферентованим љуспастим словјевима на површини или без експресије остеопонтинина на површини (остеопонтин, 400x)

У незрелим ПТ, уочене су следећи обрасци експресије остеопонтинина:

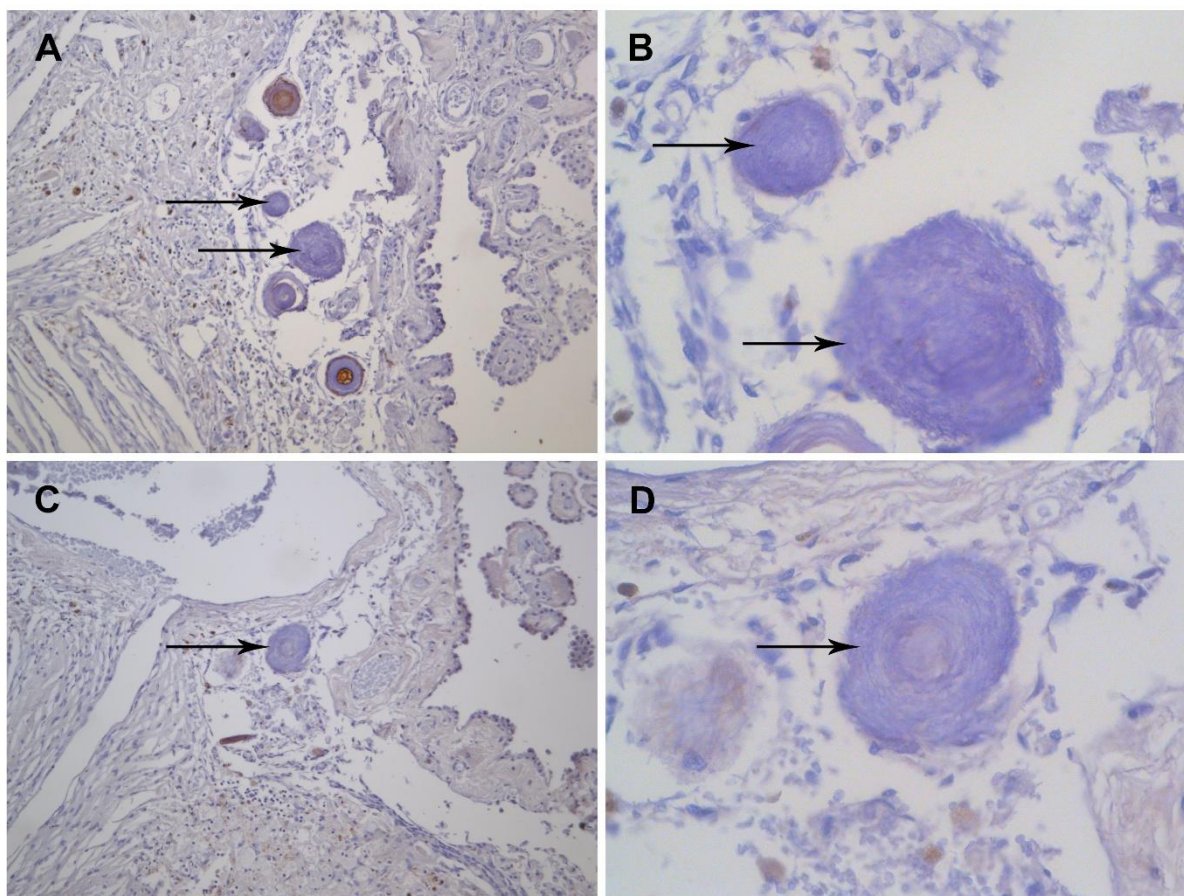
1. Униформно, хомогено пребојавање целог ПТ, када се ПТ презентује у виду сферичне формације браон боје. Потребно је нагласити да униформни, аморфни изглед пребојавања на великим увећањима задобија фибриларну, влакнасту шару (Слика 12А, 12В).
2. Хомогено, интензивно пребојавање централног дела ПТ, док се у спољашњем, периферном, прстенастом делу уочава браон бојење у виду нејасно диферентованих љуспастих слојева, али још увек нема формираних правих ламела (Слика 12С, 12Д).
3. Хомогено, интензивно пребојавање централног дела ПТ, док у спољашњем, периферном прстенастом делу нема остеопонтинске експресије, тј. спољашњи прстен пребојава се само плавом бојом (Слика 12С, 12Д, 13 и 14).
4. Мала фракција незрелих ПТ била је потпуно негативна на остеопонтин, тј. сферична калцификована структура се бојила само плавом бојом (Слика 15).



Слика 13. Имунопозитивна незрела ПТ са прстенастим слојем имунонегативности на остеопонтин испод имунопозитивне површине (А. остеопонтин, 100x; В. остеопонтин, 400x)



Слика 14. Имунопозитивна незрела ПТ са периферним прстенастим слојем имунонегативности на остеопонтин (А,С. остеопонтин, 100x; В,Д. остеопонтин, 400x)

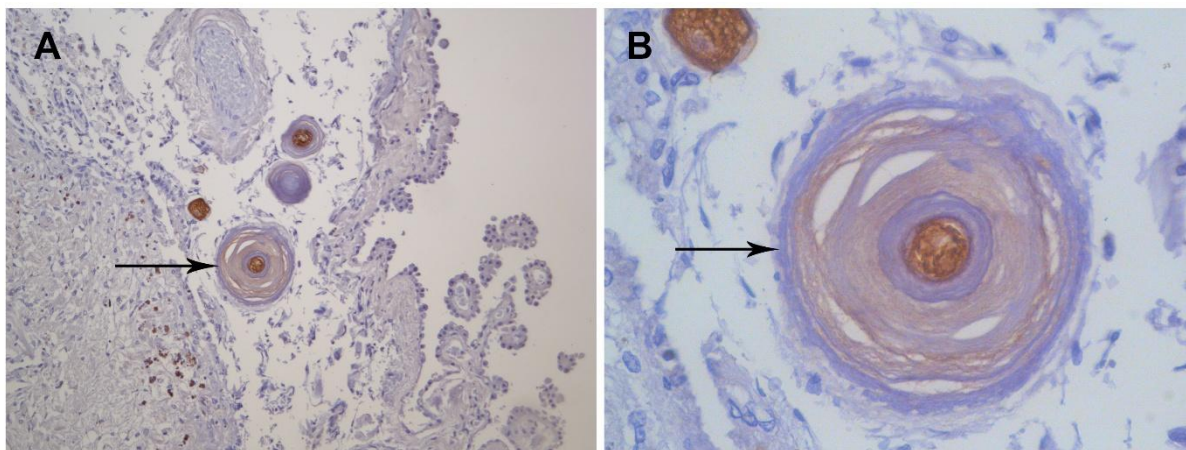


Слика 15. Имунонегативна незрела ПТ на остеопонтин (А,С. остеопонтин, 100x; В,Д. остеопонтин, 400x)

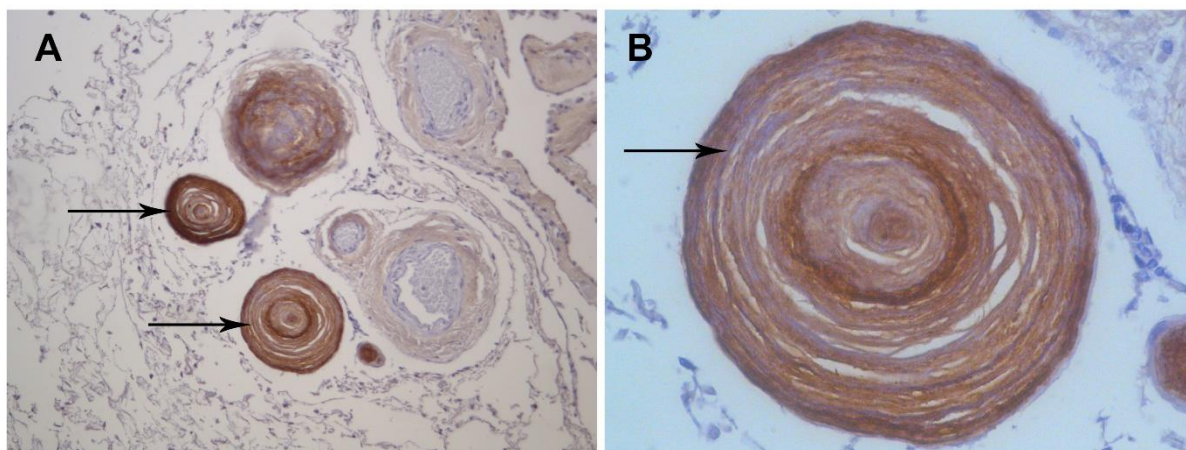
У зрелим, ламелираним ПТ, уочене су следећи обрасци експресије остеопонтина:

1. Униформно, хомогено пребојавање целог ПТ, када се ПТ презентује у виду луковичасте формације са пребојавањем централног дела и свих ламела браон бојом (Слика 16).
2. Хомогено, интензивно пребојавање централног дела ПТ, док је у концентричним ламелама експресија хетерогена, односно неки од прстенова се пребојавају браон, а поједини остају негативни на остеопонтин, тј. плави (Слика 17). То телашцима даје карактеристичан изглед мете, са наизменично распоређеним плавим и браон пребојеним љуспастим, концентричним ламелама различите дебљине и у разноврсном односу браон и плавих, односно позитивних и негативних слојева. При том, свака ламела која је позитивна на остеопонтин, испољавала је континуирано пребојавање, у виду непрекинуте линије, тј. имунопозитивност на остеопонтин била је равномерно

дистрибуирана на површини целе сфере одређене ламеле. Фокално су се између две интензивно позитивне ламеле могле уочити пукотине. Овакав облик експресије остеопонтин у ПТ представљао је доминантан налаз у нашем истраживању.



Слика 16. Хомеогено пребојена имунопозитивна зрела ПТ са израженом ламеларном грађом (А. остеопонтин, 100x; В. остеопонтин 400x)

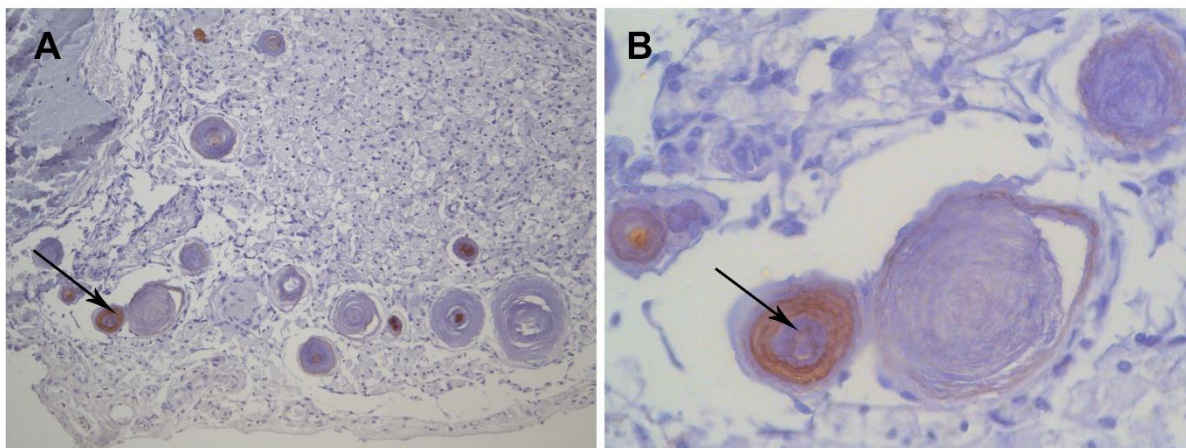


Слика 17. Имунопозитивна зрела ПТ са наизменично распоређеним плавим и браон пребојеним љуспастим, концентричним ламелама различите дебљине (А. остеопонтин, 100x; В. остеопонтин 400x)

3. Један део анализираних ПТ одликовао се негативном експресијом на остеопонтин у нивоу централног дела ПТ, који одговара језгру, тј. еволутивно најстаријем делу ПТ. Код ових псамоматозних телашаца, централни део пребојавао се плавом бојом, што указује на одсуство остеопонтин у овом делу ПТ. Са друге стране, ламеле у овим ПТ су показивале имунопозитивност на остеопонтин, слично као код другог описаног обрасца експресије. Таква

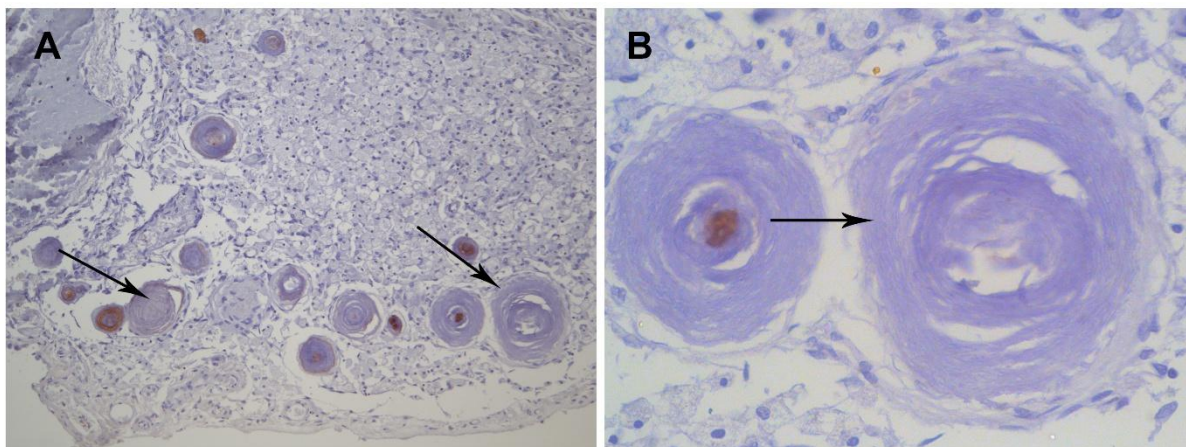


ПТ су имала карактеристичан изглед плавог центра и испругане, луковичасте плаво-браон периферије. У појединим ПТ, само су најпериферније ламеле биле позитивне на остеопонтин, те су ПТ имала изглед плаве луковице са интензивно браон рубом (Слика 18).



Слика 18. Зрела ПТ се негативном експресијом на остеопонтин у нивоу централног дела ПТ (А. остеопонтин, 100x; В. остеопонтин 400x)

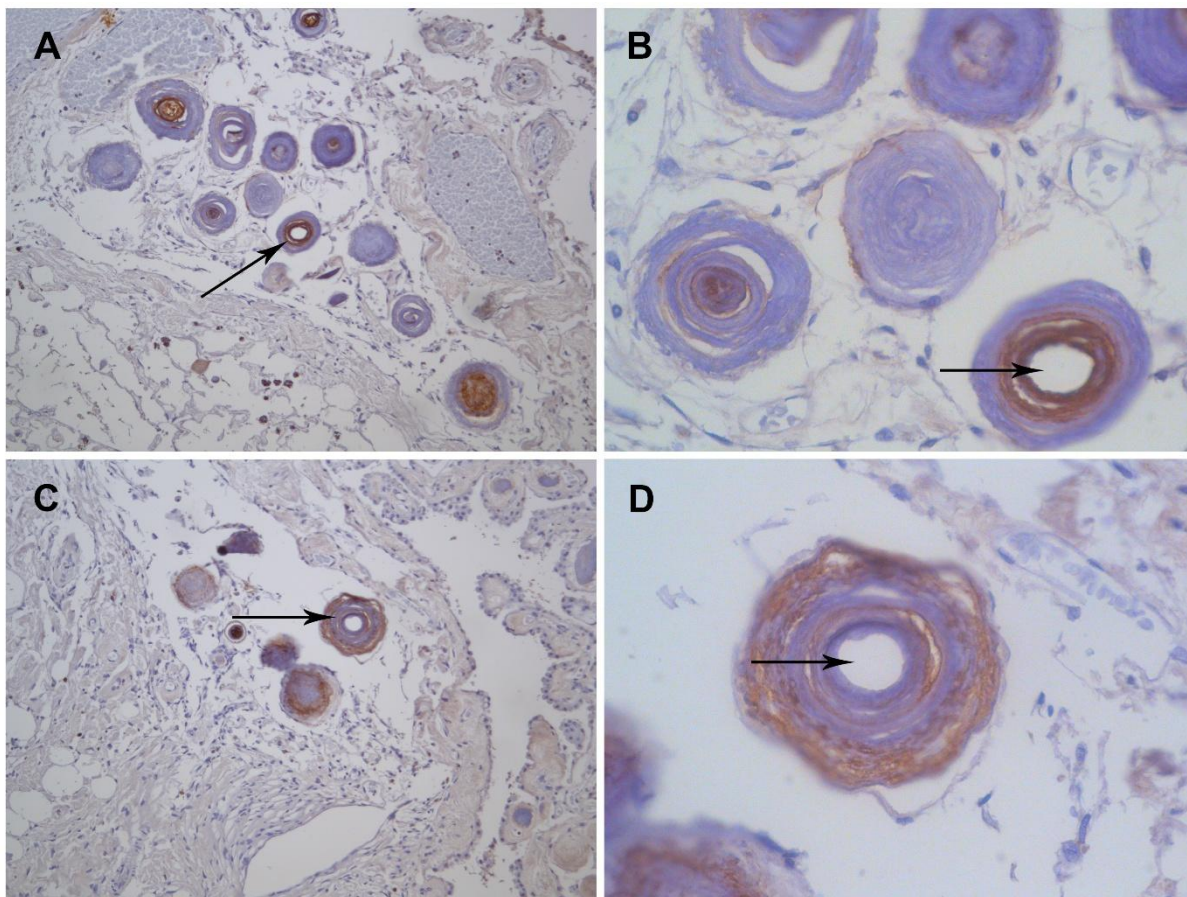
4. Мала фракција зрелих ПТ била је потпуно негативна на остеопонтин, тј. сферична калцификована структура са концентричним ламелама се бојила само плавом бојом (Слика 19).



Слика 19. Зрела негативна ПТ са ламеларном структуром (А. остеопонтин, 100x; В. остеопонтин 400x)

Код једне малог дела анализираних ПТ, уочавао се изостанак централних ламела, односно импоновало је као да језгро недостаје, док су преостале ламеле у околини дефекта или показивале униформну позитивност свих слојева, или су пак показивале хетерогену остеопонтинску експресију, са наизменичним ређањем плавих и браон слојева у различитом односу. Изостанак овог централног дела сматрали смо вероватном

последницом хистолошке обраде препарата, те овакве структуре нису класификоване ни у једну групу (Слика 20).

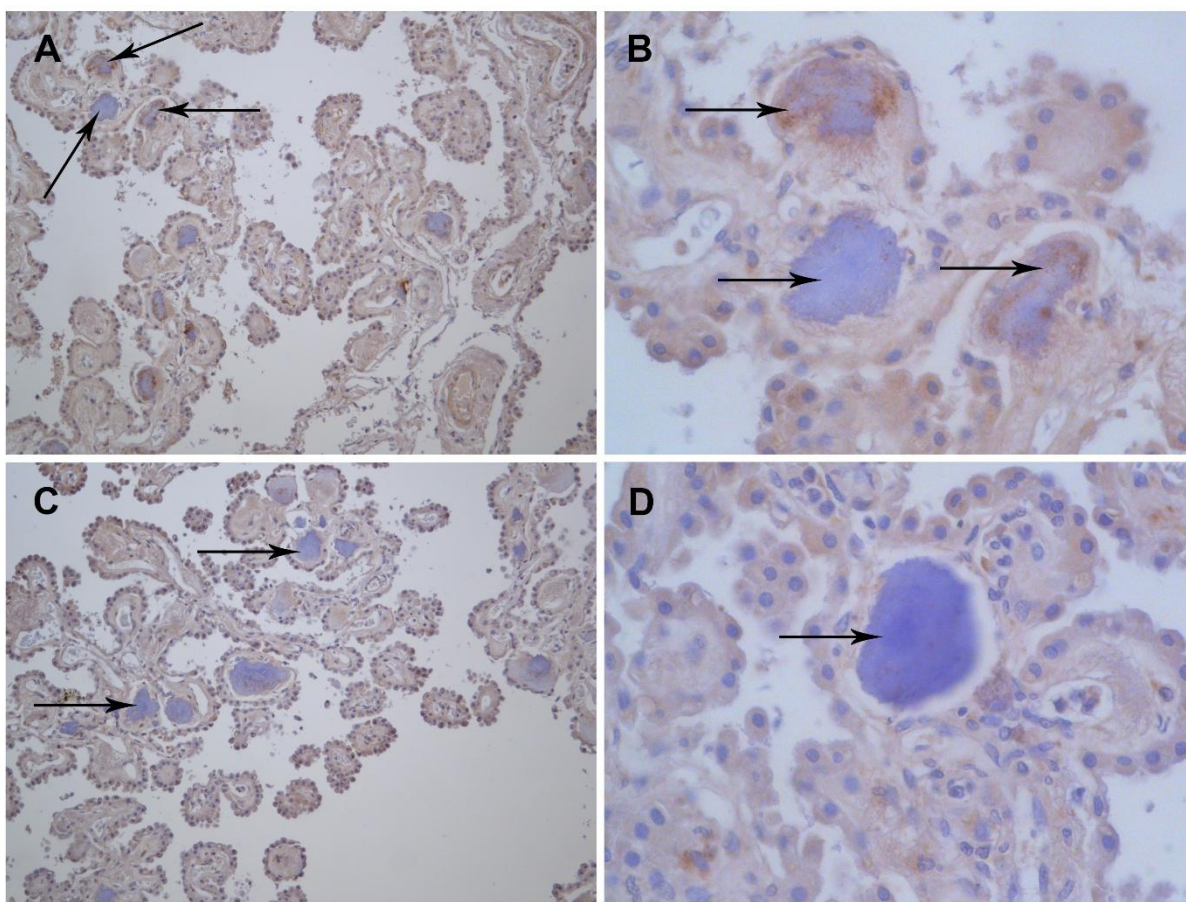


Слика 20. Зрела ламеларна ПТ са изостанком централних ламела и хетерогеном остеопонтинском експресијом на периферији, са наизменичним ређањем плавих и браон слојева: А, В. зрело ПТ са централним празним делом око ког су имунопозитивне ламеле, а на самој периферији имунонегативни прстен (А. остеопонтин, 100x; В. остеопонтин 400x); С, D. зрело ПТ са централним празним делом око ког су наизменично поређане имунонегативне и имунопозитивне ламеле (С. остеопонтин, 100x; D. остеопонтин 400x)

Није уочена закономерност у односу обрасца, тј. начина експресије остеопонтинна и величине ПТ, али је униформна пребојеност ПТ најчешће била карактеристика ПТ лоцираних у дубоким, коренским деловима папила, окруженим широким појасом строме.

#### 4.1.2.4. Имунохистохемијска анализа експресије остеокалцина у псамоматозним телашцима

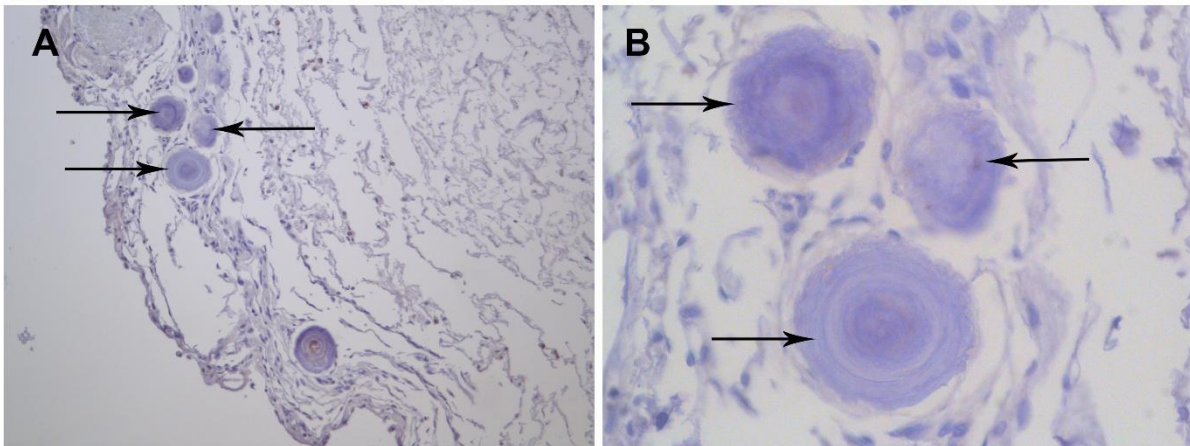
Блага имунопозитивност на остеокалцин забележена је у амилоидним депозитима, аморфним калцификацијам, док су зреле и незреле форме псамоматозних телашаца показивале израженију имунореактивност на остеокалцин. Амилоидни депозити су доминантно у потпуности били негативни на остеокалцин, али је фокално, у појединим аморфним калцификатима забележена имунореакција на остеокалцин по самој периферији калцификата, у виду браон пребојене ирегуларне, ивичне контуре (Слика 21).



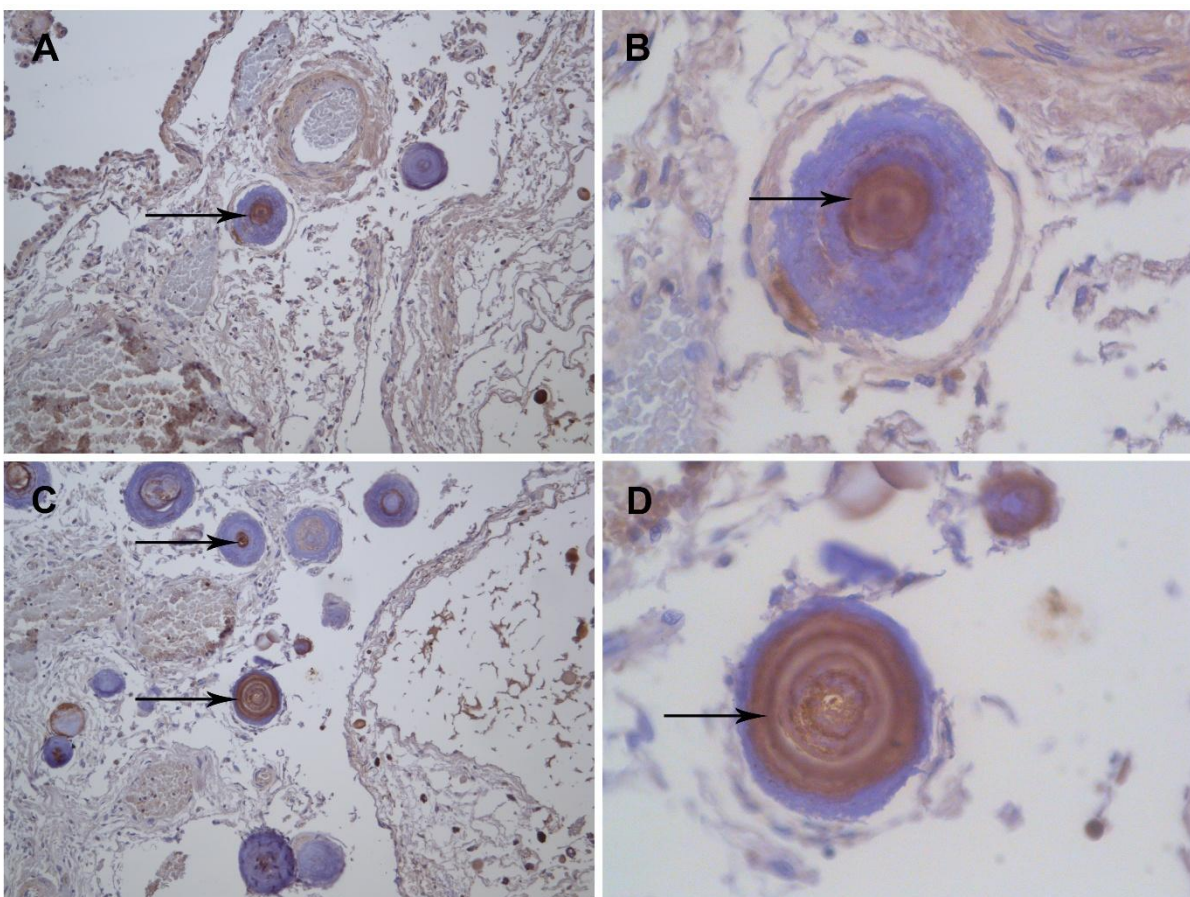
Слика 21. Благо позитивна (A, B) или потпуно негативна (C, D) имунореакција аморфних калцификата на остеокалцин (A, C. остеокалцин, 100x; B, D. Ниво експресије остеокалцина у ПТ је показивао значајну хетерогеност.

Наиме, ПТ нису показивала униформан начин експресије, већ је уочено да и незреле и зреле форме ПТ на сличан начин експримирају остеокалцин.

1. Значајан део ПТ је био потпуно негативан на експресију остеокалцина, тј. и зреле и незреле форме ПТ нису показивале браон пребојавање (имунопозитивност) (Слика 22).

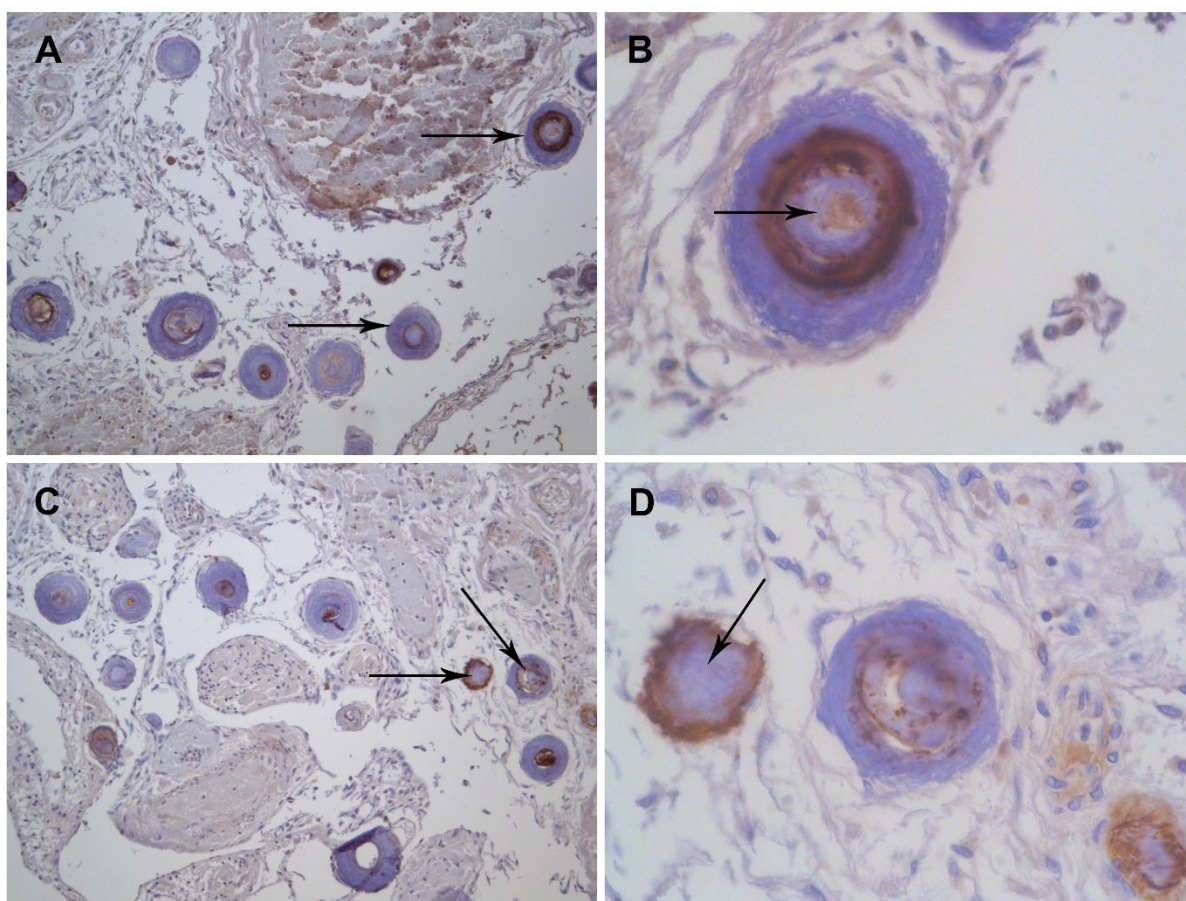


Слика 22. Потпуно негативна незрела и зрела ПТ на експресију остеокалцина (А. остеокалцин, 100x; В. остеокалцин 400x)



Слика 23. Незрели (А, В) и зрели облици ПТ (С,Д) са централном имунопозитивношћу на остеокалцин и спољњим слојевима смањене (А, В) или одсутне имунореактивности (С,Д) (А,С. остеокалцин, 100x; В, Д. остеокалцин 400x)

2. Следећу, најбројнију групу чинили су зрели и незрели облици ПТ, где је централни део показивао имунопозитивност на остеокалцин, тј. у средишњем делу сферичне формације стварао се имунопреципитат браон боје. Околни, спољашњи слојеви су могли показивати мање или више изражену имунопозитивност на остеокалцин, или је она била у потпуности одсутна (Слика 23). Запажено је да пребојавање централних делова незрелих облика ПТ, као и централних, јасно формираних ламела у зрелим формама ПТ, није показивао геометријску правилност кружног облика, као у случају имуноекспресије остеопонтинина, већ се пребојавање могло видети и у форми назупчених, звездоликих и зрнастих централних поља остеокалцинске имуноекспресије.



Слика 24. Зрели (A, B) и незрели облици ПТ (C,D) са само појединим периферним (A, B) или одобдним ламелама (C,D) које показују имунореактивност на остеокалцин (A,C. остеокалцин, 100x; B, D. остеокалцин 400x)

3. Најмања фракција зрелих и незрелих ПТ показивала је образац имунореактивности на остеокалцин у облику пребојавања само појединих од

периферно постављених ламела у зрелим, односно периферних, ободних делова незрелих ПТ (Слика 24).

Стиче се утисак да се поље позитивне имунореактивности са сазревањем телашаца шири ка периферији, односно центрифугално се помера ка перифернијим слојевима, при чему нису уочени случајеви где је присутна имунопозитивност у свим ламелама ПТ.

## 4.2. Морфометријска анализа

Морфометријска анализа се састојала из два дела, хистохемијске и имунохистохемијске анализе. У хистохемијском делу анализе одређивани су морфометријски параметри епитела и једара епителних ћелија, ПТ, присутних крвних судова и самог хороидног плексуса. У имунохистохемијском делу су анализирана само ПТ. Добијени подаци су анализирани у односу на старост, као и међусобно.

### *4.2.1. Морфометријска анализа хороидног плексуса и његовог епитела*

Параметар који је одређиван са циљем праћења старосних промена у структури хороидног плексуса, односно присуство атрофије вилуса, је површинска густина хороидног плексуса (SVch). Прокрвљеност хороидног плексуса, што може имати значајног утицаја на функцију хороидног плексуса је приказана у виду запреминске густине крвних судова (VDbv). Добијени резултати су приказани у табелама 1 и 2.

Табела 1. Површинска густина хороидног плексуса у функцији старости

Површинска густина хороидног плексуса (1/мм)				
Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
ХП леве латералне мождане коморе	12,49±2,87 13,5 (9,5-14,7)	12,26±2,75 12,2 (10,4-14,9)	8,85±2,40 8,6 (7,8-10,4)	<b>4,635 (0,022)*</b>
ХП десне латералне мождане коморе	12,80±3,38 13,4 (11,0-14,4)	13,43±3,43 12,3 (11,7-15,7)	8,47±1,17 8,3 (7,4-9,7)	<b>7,151 (0,004)*</b>
ХП треће мождане коморе	17,00±3,40 18,2 (15,5-19,0)	18,76±2,85 19,0 (15,9-21,2)	13,31±3,02 12,9 (11,3-14,7)	<b>6,437 (0,007)*</b>
ХП четврте мождане коморе	20,11±2,85 21,3 (16,8-22,2)	18,93±2,22 18,9 (17,9-20,2)	16,73±3,09 17,4 (15,6-18,2)	<b>2,486 (0,013)**</b>
<b>F (p)*</b>	<b>10,800 (0,000)</b>	<b>12,105 (0,000)</b>	<b>19,164 (0,000)</b>	
Сви хороидни плексуси	15,60±4,38 15,0 (13,0-19,0)	15,85±4,10 15,5 (12,1-19,2)	11,84±4,22 10,5 (8,3-15,3)	<b>9,014 (0,000)*</b>

\* ANOVA  
\*\* Џонкхир-Терпстра тест

Табела 2. Запреминска густина крвних судова у хороидном плексусу у функцији старости

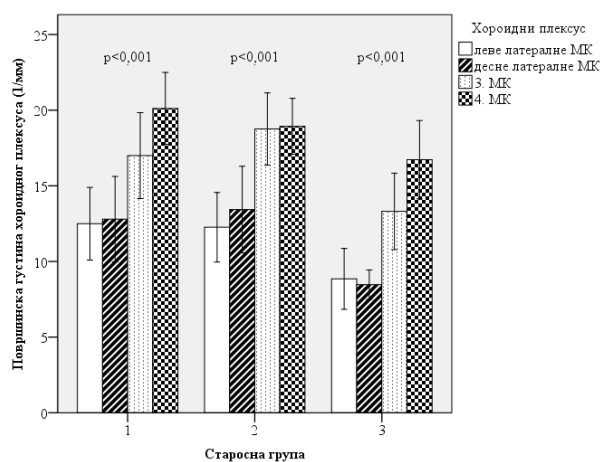
Запреминска густина крвних судова (1/1)				
Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
ХП леве латералне мождане коморе	13,13±3,07 13,4 (10,8-13,8)	12,18±3,12 12,5 (11,0-13,7)	8,81±1,35 9,0 (7,6-9,6)	5,886 (0,009)*
ХП десне латералне мождане коморе	14,26±4,66 13,7 (13,2-15,8)	12,32±3,84 11,8 (11,2-12,8)	9,12±1,93 8,5 (8,0-10,5)	3,174 (0,002)**
ХП треће мождане коморе	12,09±1,78 11,7 (10,6-12,9)	9,43±2,17 8,5 (8,1-11,3)	8,84±1,50 8,4 (8,0-9,9)	7,096 (0,004)*
ХП четврте мождане коморе	12,31±2,24 12,4 (10,6-13,9)	9,01±1,35 8,7 (8,1-9,8)	8,12±2,63 7,1 (6,9-9,9)	8,515 (0,002)*
<b>F (p) *</b>		8,057	0,396 (0,757)*	
<b>χ<sup>2</sup> (p) ***</b>	4,452 (0,217)***	(0,045)***		
Сви хороидни плексуси	12,95±3,10 13,1 (11,2-13,9)	10,73±3,07 10,9 (8,3-12,5)	8,82±1,86 8,4 (7,2-9,6)	5,832 (0,000)**

\* ANOVA  
\*\* Џонкхир-Терпстра тест  
\*\*\* Крускал-Валисов тест

Добијени резултати показују да постоји статистички значајно смањење површинске густине хороидног плексуса са старошћу. Ова разлика је најизраженија не преласку у трећу старосну групу, односно након 70. године живота. Статистички значајна разлика је утврђена у сва четири хороидна плексуса можданих комора (лева

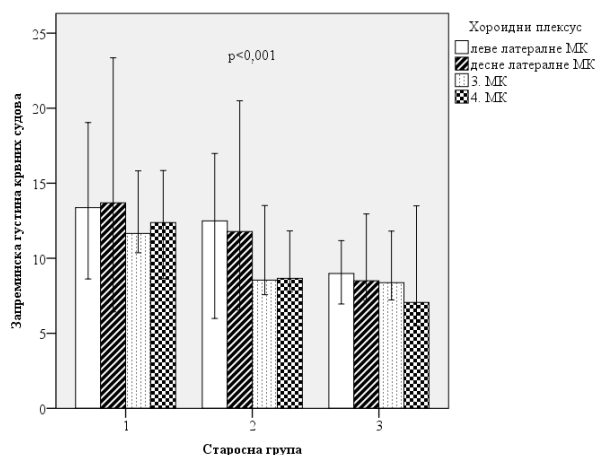
латерална  $p < 0,05$ , десна латерална  $p < 0,01$ , трећа  $p < 0,01$  и четврта мождана комора  $p < 0,05$ ). SVch је статистички значајно већа у 3. и 4. можданој комори у односу на латералне у свим старосним групама ( $p < 0,001$ ) (Графикон 1). Што се тиче запреминске густине крвних судова, уочава се снижење овог параметра током старости ( $p < 0,01$ ). У оквиру старосних група, може се уочити да је запреминска густина крвних судова мања у хороидним плексусима 3. и 4. мождане коморе, у поређењу са латералним коморама (Графикон 2). Међутим, ова разлика је статистички значајна само у другој старосној групи ( $p < 0,05$ ), што наводи на чињеницу да је смањење запреминске густине крвних судова у хороидном плексусу брже у 3. и 4. можданој комори у ранијој животној доби (након 50. године живота), док се промене у латералним можданим коморама одвијају брже након 70. године живота. Као што је и очекивано, не постоји статистички значајна разлика у SVch и VDbv између хороидних плекуса леве и десне латералне коморе

На следећим графиконима 1 и 2 могу се видети упоредне карактеристике хороидних плекуса леве десне латералне мождане коморе. Вредности са нормалном дистрибуцијом су поређене Студентовим t-тестом, док је у супротном коришћен Ман-Витнијев U-тест. Као што је и очекивано, није уочена статистички значајна разлика.



Графикон 1. Просечне вредности површинске густине хороидних плекуса леве и десне латералне мождане коморе





Графикон 2. Медијана запреминске густине крвних судова хороидних плексуса леве и десне латералне мождане коморе

Методом астереологије анализирани су епителне ћелије хороидног плексуса. Добијене су следеће карактеристике епителних ћелија: ареа (Ас), периметар (Вс), Феретов дијаметар (Дс), обликовани фактор (А/Вс), висина епитела (Нер), као и нуклео-цитоплазматски однос (N/C). Сви претходно поменути морфометријски параметри су анализирани и у случају једара (An, Vn, Dn, A/Vn). Добијени резултати анализирани ANOVA методом, за сваки од узоркованих хороидних плексуса, су приказани у табелама 3-7.

Са старошћу, долази до пораста арее, периметра и Феретовог дијаметра епителних ћелија, након 50. године живота ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$ ). Ћелије постају неправилнијег облика ( $p < 0,001$ ), односно долази до њиховог спљоштавања ( $p < 0,01$ ). Такође, расте и нуклео/цитоплазматски однос ( $p < 0,001$ ), без обзира на упоредан пораст и арее, периметра и Феретовог дијаметра једара епиталних ћелија ( $p < 0,001$ ), а само једро постаје све елиптичније ( $p < 0,05$ ). Сличне промене се могу видети и сваком од четири анализираних хороидних плексуса.

У хороидним плексусима латералних можданих комора (Табеле 4 и 5), иако постоји тренд повећања арее епителних ћелија, није утврђена статистичка значајност ових разлика. Уочен је значајан пораст периметра ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ ) и Феретовог дијаметра епителних ћелија ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$ ), као то да облик ћелија постаје неправилнији са старошћу ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ ). Ове промене су најизраженије са прелаза из 1. у 2. старосну групу, односно након 50. године живота. Иако је пораст арее ( $p < 0,05$ ), периметра ( $p < 0,01$ ) и Феретовог дијаметра једара епителних ћелија ( $p < 0,01$ ) био статистички значајан само у левој можданој комори, нуклео-цитоплазматски однос се

повећаа у обе латералне мождане коморе ( $p < 0,05$ ), што указује на интензивнији порсат величине једра у односу на величину ћелије.

*Табела 3. Морфометријске карактеристике епитела хородног плексуса и једара епителних ћелија*

Старосна група	I	II	III	F (p)
Ареа епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	88,61 $\pm$ 8,30	95,31 $\pm$ 10,40	94,17 $\pm$ 9,46	<b>4,615</b>
	87,0 (84,6-91,4)	94,0 (90,0-101,4)	94,0 (86,9-98,1)	<b>(0,012)</b>
Периметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	35,22 $\pm$ 1,68	37,31 $\pm$ 1,94	37,93 $\pm$ 1,83	<b>19,487</b>
	35,1 (34,0-36,1)	37,0 (36,0-38,9)	38,1 (37,2-39,0)	<b>(0,000)</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	13,14 $\pm$ 0,66	14,35 $\pm$ 0,71	14,75 $\pm$ 0,92	<b>37,802</b>
	13,0 (12,8-13,4)	14,4 (13,9-14,8)	14,7 (14,3-15,5)	<b>(0,000)</b>
Обликовани фактор епителних ћелија (1/1)	0,89 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,04	<b>29,129</b>
	0,9 (0,9-0,9)	0,9 (0,8-0,9)	0,8 (0,8-0,8)	<b>(0,000)</b>
Висина епитела ( $\mu\text{m}$ )	8,51 $\pm$ 0,67	8,31 $\pm$ 0,72	7,89 $\pm$ 0,85	<b>6,114</b>
	8,7 (8,3-9,0)	8,4 (7,8-8,6)	7,3 (7,8-8,3)	<b>(0,003)</b>
Нуклео-цитоплазматски однос (1/1)	0,26 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,03	<b>16,282</b>
	0,3 (0,2-0,3)	0,3 (0,2-0,3)	0,3 (0,3-0,3)	<b>(0,000)</b>
Ареа једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	17,85 $\pm$ 1,96	19,66 $\pm$ 2,62	20,55 $\pm$ 2,72	<b>10,016</b>
	17,5 (16,6-18,2)	18,9 (18,3-20,4)	21,0 (18,4-21,9)	<b>(0,000)</b>
Периметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	15,70 $\pm$ 0,93	16,62 $\pm$ 1,00	17,04 $\pm$ 1,08	<b>14,910</b>
	15,6 (15,2-16,0)	16,5 (16,1-17,0)	17,2 (16,1-17,7)	<b>(0,000)</b>
Феретов дијаметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	5,83 $\pm$ 0,35	6,22 $\pm$ 0,31	6,37 $\pm$ 0,34	<b>22,019</b>
	5,8 (5,6-6,1)	6,2 (6,0-6,3)	6,4 (6,1-6,5)	<b>(0,000)</b>
Обликовани фактор једара епителних ћелија (1/1)	0,91 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	<b>3,845</b>
	0,9 (0,9-0,9)	0,9 (0,9-0,9)	0,9 (0,9-0,9)	<b>(0,025)</b>

Табела 4. Морфометријске карактеристике епитела хородног плексуса и једара епителних ћелија у левој латералној мозданој комори

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
Ареа епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	86,39 $\pm$ 4,90 85,8 (83,0-86,7)	98,06 $\pm$ 10,85 95,3 (89,2-109,9)	91,17 $\pm$ 9,21 92,5 (84,4-94,1)	1,375 (0,169)**
Периметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	34,78 $\pm$ 1,50 34,6 (33,5-36,0)	38,1 $\pm$ 1,72 37,8 (36,6-40,0)	37,32 $\pm$ 1,58 37,6 (36,3-38,4)	<b>9,372</b> <b>(0,001)*</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	13,01 $\pm$ 0,78 13,0 (12,3-13,6)	14,68 $\pm$ 0,40 14,7 (14,3-15,0)	14,33 $\pm$ 0,40 14,4 (14,3-14,5)	<b>19,983</b> <b>(0,000)*</b>
Обликовани фактор епителних ћелија (1/1)	0,89 $\pm$ 0,05 0,9 (0,9-0,9)	0,85 $\pm$ 0,02 0,8 (0,8-0,9)	0,83 $\pm$ 0,03 0,8 (0,8-0,8)	<b>5,673</b> <b>(0,011)*</b>
Висина епитела ( $\mu\text{m}$ )	8,51 $\pm$ 0,68 8,7 (8,2-9,0)	8,48 $\pm$ 0,52 8,5 (8,2-9,0)	7,82 $\pm$ 0,87 7,6 (7,3-7,9)	2,457 (0,110)*
Нуклео-цитоплазматски однос (1/1)	0,26 $\pm$ 0,03 0,3 (0,2-0,3)	0,28 $\pm$ 0,04 0,3 (0,2-0,3)	0,31 $\pm$ 0,02 0,3 (0,3-0,3)	<b>1,011</b> <b>(0,033)*</b>
Ареа једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	17,43 $\pm$ 2,01 17,1 (16,1-17,6)	20,98 $\pm$ 3,16 20,1 (18,7-23,6)	20,61 $\pm$ 2,40 21,1 (18,4-21,9)	<b>4,631</b> <b>(0,022)*</b>
Периметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	15,22 $\pm$ 1,18 15,0 (14,1-15,9)	17,11 $\pm$ 1,27 16,9 (16,1-18,2)	17,05 $\pm$ 0,96 17,2 (16,2-17,9)	<b>7,058</b> <b>(0,005)*</b>
Феретов дијаметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	5,66 $\pm$ 0,45 5,6 (5,3-6,1)	6,3 $\pm$ 0,48 6,2 (6,0-6,6)	6,36 $\pm$ 0,23 6,4 (6,2-6,5)	<b>7,660</b> <b>(0,003)*</b>
Обликовани фактор једара епителних ћелија (1/1)	0,91 $\pm$ 0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,91 $\pm$ 0,00 0,9 (0,9-0,9)	0,91 $\pm$ 0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,185 (0,853)**

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

Табела 5. Морфометријске карактеристике епитела хородног плексуса и једара епителних ћелија у десној латералној мозданој комори

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
Ареа епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	91,83±6,22 91,8 (87,6-97,2)	97,88±11,68 95,5 (87,9-108,7)	95,49±8,09 97,5 (87,5-101,3)	0,924 (0,412)*
Периметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	35,71±1,50 35,3 (34,6-37,3)	37,63±2,18 36,8 (35,9-39,8)	37,80±1,48 37,9 (37,6-38,5)	<b>3,518 (0,048)*</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	13,24±0,62 13,2 (12,8-13,7)	14,34±0,82 14,0 (13,8-15,1)	14,55±0,84 14,6 (13,9-15,3)	<b>6,782 (0,005)*</b>
Обликовани фактор епителних ћелија (1/1)	0,89±0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,85±0,03 0,9 (0,9-0,9)	0,84±0,05 0,8 (0,8-0,9)	<b>3,386 (0,001)**</b>
Висина епитела ( $\mu\text{m}$ )	8,76±0,31 8,8 (8,4-9,0)	8,50±0,65 8,5 (8,0-9,0)	8,18±0,83 7,7 (8,2-8,6)	1,688 (0,209)*
Нуклео-цитоплазматски однос (1/1)	0,26±0,03 0,3 (0,2-0,3)	0,27±0,04 0,3 (0,2-0,3)	0,30±0,02 0,3 (0,3-0,3)	<b>4,365 (0,026)*</b>
Ареа једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	18,50±2,31 17,9 (17,0-21,1)	19,81±2,02 19,5 (18,6-20,4)	20,98±2,54 21,2 (18,7-22,3)	2,339 (0,121)*
Периметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	1603±0,96 15,9 (15,3-17,0)	16,66±0,71 16,5 (16,2-16,9)	17,14±1,02 17,4 (16,1-17,7)	3,075 (0,067)*
Феретов дијаметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	5,92±0,37 5,9 (5,6-6,2)	6,24±0,14 6,2 (6,1-6,3)	6,35±0,35 6,3 (6,1-6,5)	1,799 (0,072)**
Обликовани фактор једара епителних ћелија (1/1)	0,91±0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,90±0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,90±0,01 0,9 (0,9-0,9)	1,587 (0,113)**

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

У хорондном плексусу 3. моздане коморе (Табела 6), поменуте промене су мање изражене. Старење се одражава, пре свега, променама на самим епителним ћелија у смислу пораста периметра ( $p < 0,01$ ) и Феретовог дијаметра ( $p < 0,0015$ ), као и променама у облику ћелија ( $p < 0,01$ ). Међутим, статистички значајна је и разлика у Феретовом дијаметру једара епителних ћелија између различитих старосних група ( $p < 0,05$ ).

Табела 6. Морфометријске карактеристике епитела хородног плексуса и једара епителних ћелија у 3. можданог комори

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
Ареа епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	86,36 $\pm$ 7,39 85,6 (84,1-90,3)	92,39 $\pm$ 9,39 91,5 (83,4-98,4)	92,93 $\pm$ 8,35 94,5 (87,3-98,1)	1,500 (0,246)*
Периметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	35,14 $\pm$ 1,17 35,2 (34,5-35,8)	36,74 $\pm$ 17,79 36,8 (35,0-38,4)	37,63 $\pm$ 2,00 38,2 (37,0-38,9)	<b>2,698</b> <b>(0,007)**</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	12,93 $\pm$ 0,30 12,9 (12,7-13,2)	13,85 $\pm$ 0,65 13,9 (13,4-14,5)	14,47 $\pm$ 1,02 14,7 (13,9-15,0)	<b>9,168</b> <b>(0,001)*</b>
Обликовани фактор епителних ћелија (1/1)	0,89 $\pm$ 0,03 0,9 (0,9-0,9)	0,86 $\pm$ 0,02 0,9 (0,8-0,9)	0,84 $\pm$ 0,04 0,8 (0,8-0,9)	<b>6,615</b> <b>(0,006)*</b>
Висина епитела ( $\mu\text{m}$ )	8,75 $\pm$ 0,81 8,8 (8,6-9,4)	8,48 $\pm$ 0,79 8,5 (8,0-8,6)	8,05 $\pm$ 0,88 8,0 (7,3-8,3)	1,445 (0,258)*
Нуклео-цитоплазматски однос (1/1)	0,26 $\pm$ 0,02 0,3 (0,2-0,3)	0,27 $\pm$ 0,03 0,3 (0,2-0,3)	0,28 $\pm$ 0,02 0,3 (0,3-0,3)	1,563 (0,233)*
Ареа једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	17,81 $\pm$ 1,63 17,7 (17,5-18,2)	1,13 $\pm$ 2,81 18,6 (17,9-20,6)	19,07 $\pm$ 2,02 19,1 (17,1-21,0)	1,640 (0,101)**
Периметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	15,74 $\pm$ 0,66 15,7 (15,5-16,0)	16,32 $\pm$ 1,05 16,2 (15,9-16,9)	16,44 $\pm$ 0,85 16,6 (15,5-17,3)	1,495 (0,247)*
Феретов дијаметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	5,78 $\pm$ 0,24 5,7 (5,6-6,0)	6,12 $\pm$ 0,33 6,1 (5,9-6,4)	6,17 $\pm$ 0,25 <sup>#</sup> 6,2 (5,9-6,3)	<b>4,627</b> <b>(0,022)*</b>
Обликовани фактор једара епителних ћелија (1/1)	0,91 $\pm$ 0,03 0,9 (0,9-0,9)	0,90 $\pm$ 0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,89 $\pm$ 0,01 0,9 (0,9-0,9)	2,670 (0,093)*

\* ANOVA

\*\* Донкхир-Терпстра тест

<sup>#</sup> p<0,05 (vs. I)

У узорцима из 4. мождане коморе, може се уочити статистички значајна разлика у свим одреживаним параметрима између старосних група, осим за ареу и висину епителних ћелија, као и облик њихових једара. Као што је већ уочено на узорцима хороидних плексуса из других можданих комора, са старошћу расте величина епителних ћелија, односно њихов периметар ( $p<0,01$ ) и Феретов дијаметар ( $p<0,001$ ), уз то постају све неправилнијег, мање округлог, облика ( $p<0,001$ ). Пораст величине једра је још бржи и израженији, те се уочава повећање арее ( $p<0,01$ ), периметра ( $p<0,05$ ) и Феретовог дијаметра једра ( $p<0,01$ ), као и пораст нуклео-цитоплазматског односа ( $p<0,01$ ).

Табела 7. Морфометријске карактеристике епитела хородног плексуса и једара епителних ћелија у 4. мозданој комори

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
Ареа епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	89,87 $\pm$ 12,75	92,90 $\pm$ 10,19	97,08 $\pm$ 12,37	0,750
	88,7 (82,6-89,7)	93,5 (91,6-98,1)	96,5 (89,1-108,7)	(0,485)*
Периметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	35,24 $\pm$ 2,48	36,77 $\pm$ 2,05	38,97 $\pm$ 2,11	<b>2,910</b>
	34,4 (33,8-35,9)	36,8 (35,2-38,8)	39,0 (38,1-40,8)	<b>(0,004)**</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	13,36 $\pm$ 0,84	14,52 $\pm$ 0,74	15,63 $\pm$ 0,77	<b>4,073</b>
	13,0 (12,8-13,8)	14,6 (14,0-14,9)	15,9 (15,4-16,2)	<b>(0,000)**</b>
Обликовани фактор епителних ћелија (1/1)	0,88 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,04	<b>14,183</b>
	0,9 (0,9-0,9)	0,8 (0,8-0,9)	0,8 (0,8-0,8)	<b>(0,000)*</b>
Висина епитела ( $\mu\text{m}$ )	8,15 $\pm$ 0,82	7,78 $\pm$ 0,73	7,52 $\pm$ 0,85	1,329
	8,2 (7,5-8,7)	7,8 (7,5-8,1)	7,4 (6,8-8,3)	(0,286)*
Нуклео-цитоплазматски однос (1/1)	0,26 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03	<b>3,174</b>
	0,2 (0,2-0,3)	0,3 (0,3-0,3)	0,3 (0,3-0,3)	<b>(0,002)**</b>
Ареа једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}^2$ )	17,67 $\pm$ 2,06	18,71 $\pm$ 2,24	21,54 $\pm$ 3,56	<b>2,592</b>
	16,9 (16,5-18,8)	18,4 (17,8-19,0)	21,4 (18,3-25,3)	<b>(0,010)**</b>
Периметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	15,81 $\pm$ 0,83	16,39 $\pm$ 0,86	17,51 $\pm$ 1,33	<b>5,579</b>
	15,5 (15,3-16,4)	16,3 (16,1-16,7)	17,6 (16,3-18,9)	<b>(0,011)*</b>
Феретов дијаметар једара епителних ћелија ( $\mu\text{m}$ )	5,98 $\pm$ 0,27	6,19 $\pm$ 0,23	6,61 $\pm$ 0,40	<b>8,739</b>
	5,9 (5,8-6,0)	6,2 (6,1-6,2)	6,6 (6,4-7,0)	<b>(0,002)*</b>
Обликовани фактор једара епителних ћелија (1/1)	0,90 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,01	1,825
	0,9 (0,9-0,9)	0,9 (0,9-0,9)	0,9 (0,9-0,9)	(0,186)*

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

С обзиром да обликовани фактор указује само на неправилност облика, а не и на правац елиптичности епителних ћелија, односно да ли се ради о издужености ћелија у висину или о спљоштености ћелија. Однос висине епителних ћелија и Феретовог дијаметра нам управо указује на то да ли долази до спљоштавања епитела са старошћу (Табела 8). С обзиром да се овај однос смањује са порастом животне доби у свим хоронидним плексусима (лева латерална  $p < 0,01$ , десна латерална  $p < 0,01$ , трећа  $p < 0,01$ , и четврта моздана комора  $p < 0,001$ ), закључујемо да долази до спљоштавања епитела.

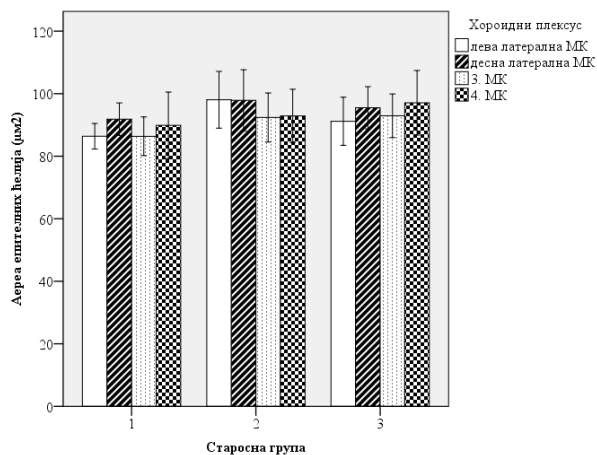
Табела 8. Однос висине и Феретовог дијаметра епителних ћелија у функцији старости

Старосна група	Однос висине епителних ћелија и Феретовог дијаметра			F (p)*
	I	II	III	
ХП леве латералне мождане коморе	0,66±0,08	0,58±0,03	0,55±0,06	<b>8,093 (0,002)</b>
	0,7 (0,6-0,7)	0,6 (0,6-0,6)	0,5 (0,5-0,6)	
ХП десне латералне мождане коморе	0,66±0,05	0,59±0,04	0,57±0,08	<b>6,173 (0,008)</b>
	0,7 (0,6-0,7)	0,6 (0,6-0,7)	0,6 (0,5-0,6)	
ХП треће мождане коморе	0,68±0,07	0,61±0,05	0,56±0,08	<b>6,264 (0,007)</b>
	0,7 (0,6-0,7)	0,6 (0,5-0,6)	0,6 (0,5-0,6)	
ХП четврте мождане коморе	0,61±0,05	0,54±0,05	0,48±0,05	<b>13,895 (0,000)</b>
	0,6 (0,6-0,7)	0,6 (0,6-0,7)	0,5 (0,5-0,5)	
F (p)*	1,784 (0,173)	<b>4,621 (0,010)</b>	<b>7,923 (0,048)**</b>	
$\chi^2$ (p)**				
Сви хороидни плексуси	0,65±0,06	0,58±0,05	0,54±0,07	<b>27,348 (0,000)</b>
	0,7 (0,6-0,7)	0,6 (0,5-0,6)	0,5 (0,5-0,6)	

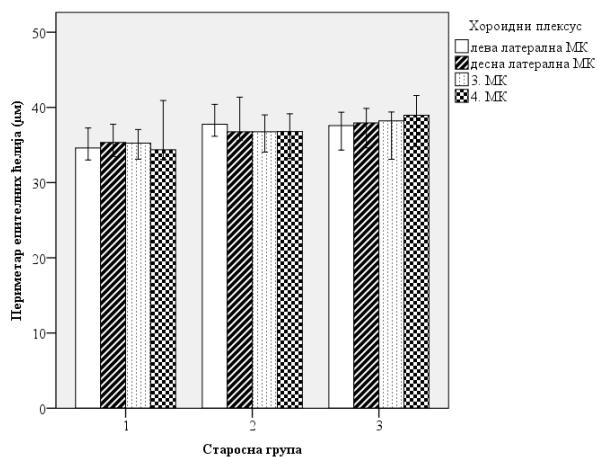
\* ANOVA

\*\* Крускал-Валисов тест

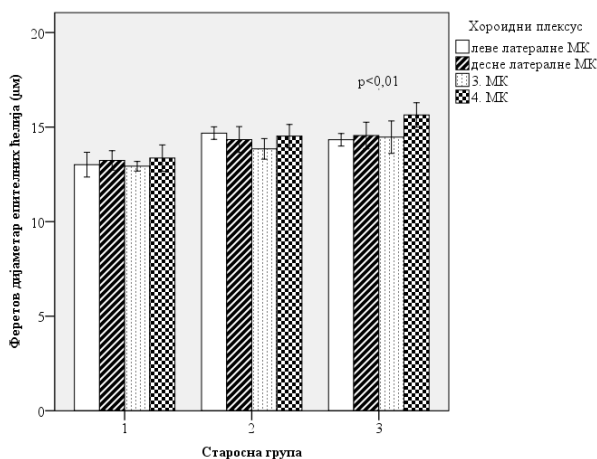
На графиконима 3-13 су приказане упоредне карактеристике епителних ћелија и једара епителних ћелија хороидних плексуса леве, десне латералне, треће и четврте мождане коморе. Подаци са нормалном дистрибуцијом су анализирани параметријском ANOVA анализом, док је у супротном коришћен Крускал-Валисов тест. Као што је и очекивано, нису уочене статистички значајне разлике у морфометријским параметрима епителних ћелија и њихових једара између хороидних плексуса леве и десне мождане коморе. Такође, мерени морфометријски параметри епитела хороидних плексуса су били слични у тећој и четвртој можданој комори. Међутим, у појединим старосним групама постојала је статистички значајна разлика између хороидних плексуса латералних можданих комора, у поређењу са друге две. У најстаријој старосној групи, Феретов дијаметар ( $p < 0,01$ ) и нуклео-цитоплазматски однос епителних ћелија хороидног плексуса ( $p < 0,05$ ) у 4. можданој комори је већи у поређењу са осталим. У средњој старосној групи, епителне ћелије хороидног плексуса 4. мождане коморе су спљоштеније ( $p < 0,05$ ), а њихова једра мање округла ( $p < 0,05$ ).



Графикон 3. Просечне вредности араа епителних ћелија

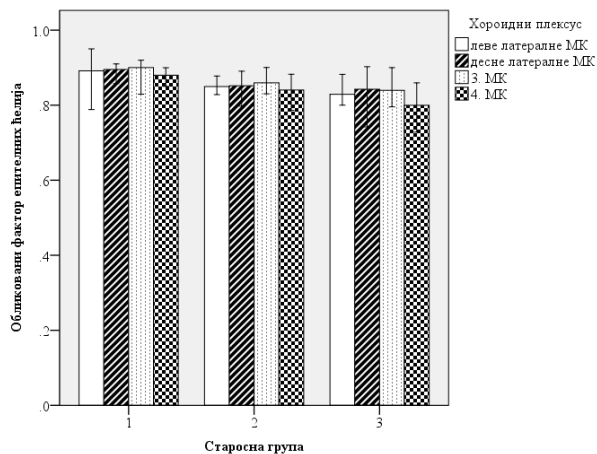


Графикон 4. Медијана периметра епителних ћелија

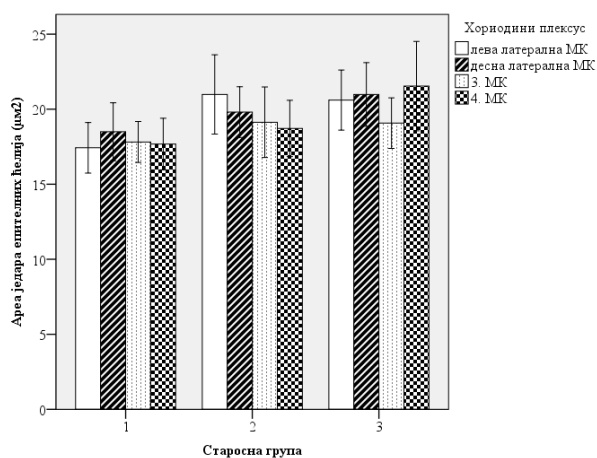


Графикон 5. Просечан Феретов дијаметар епителних ћелија

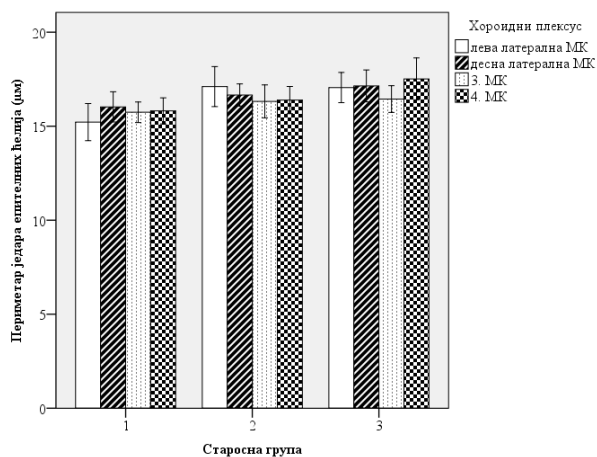




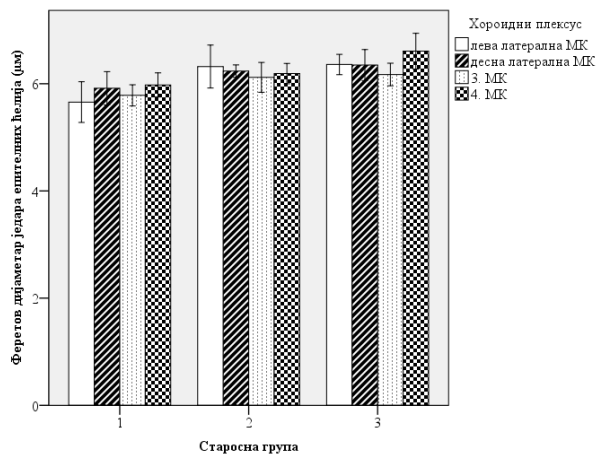
Графикон 6. Медијана обликованог фактора епителних ћелија



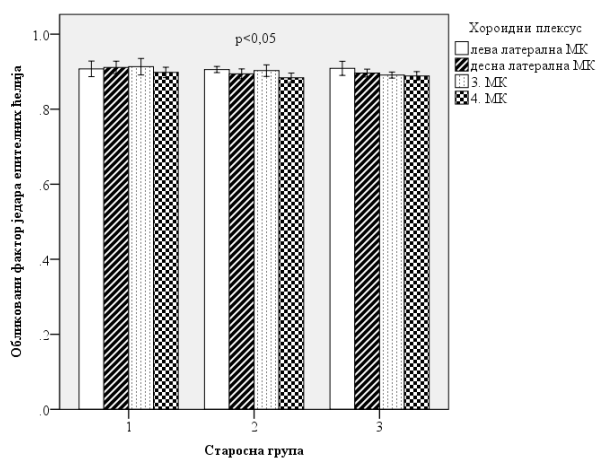
Графикон 7. Просечна ареа једара епителних ћелија



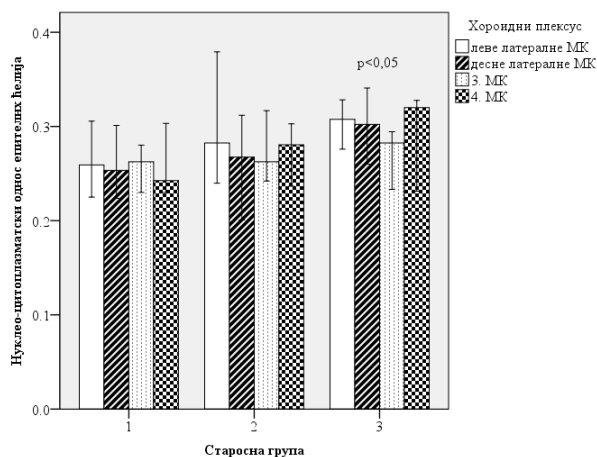
Графикон 8. Просечан периметар једара епителних ћелија



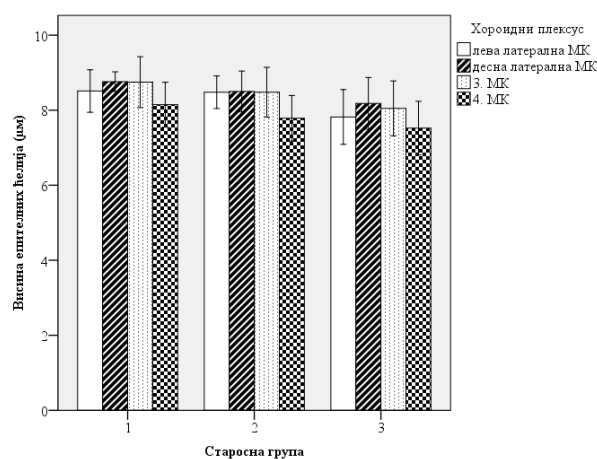
Графикон 9. Просечан Феретов дијаметар једара епителних ћелија



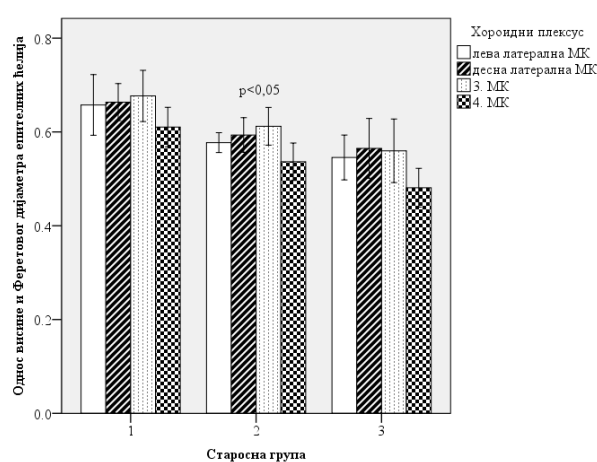
Графикон 10. Просечан обликовани фактор једара епителних ћелија



Графикон 11. Просечан нуклео-цитоплазматски однос епителних ћелија



Графикон 12. Просечна висина епитела



Графикон 13. Просечан однос висине и Феретовог дијаметра епителних ћелија

#### 4.2.2. Морфометријска анализа псамоматозних телашаца

Методом стереологије, одређена је нумеричка (NDpb) и запреминска густина псамоматозних телашаца (VDpb). Астереолошки, добијени су укупна ареа (TApb), просечна ареа (Апт), периметар (Vpb), Феретов дијаметар (Dpb) и обликовани фактор псамоматозних телашаца (A/Vpb) за сваки случај. У пет узорка, четири из четврте мождане коморе (старости 35, 44, 59 и 69 година) и један из треће мождане коморе (старости 44 године). Ови случајеви нису узети у разматрање при морфометријској анализи псамоматозних телашаца.

У Табели 9 су приказане упоредне карактеристике случајева са и без ПТ. Видно је да су лица од којих су узети узорци без ПТ нешто млађа (просечна вредност је 50 година, у односу на 62 године). Осим тога, ПТ су били одсутни у узорцима са већом

SVch и VDbv, мањим, нижим и округлијим епителним ћелијама, као и мањим једрима и мањим N/C односом. Статистичка значајност разлика није нађена за све морфометријске параметре хороидних плексуса, што је на вероватније последица малог броја узорача без ПТ (само 5). Статистичка повезаност одсуства ПТ је уочена са мањом ареом ( $p < 0,05$ ) и нижим епителним ћелијама ( $p < 0,05$ ) са једрима мање арее ( $p < 0,05$ ).

Табела 9. Упоредне карактеристике узорача без и са ПТ

	Без ПТ	Са ПТ	t(p) * Z (p) **
Старост (год.)	50,20±13,59 44,0 (39,5-64,0)	62,16±14,01 63,0 (47,0-75,0)	1,862 (0,066)*
Површинска густина хороидног плексуса (1/мм)	19,91±3,08 19,0 (17,3-23,0)	14,13±4,46 14,1 (10,2-18,1)	0,423 (0,673)*
Запреминска густина крвних судова (1/1)	11,40±2,72 10,4 (9,5-13,9)	10,77±3,25 10,6 (8,3-12,9)	0,585 (0,558)**
Ареа епителних ћелија (μм <sup>2</sup> )	83,78±11,19 81,1 (73,7-95,2)	93,19±9,52 92,0 (86,2-98,0)	<b>2,133 (0,036)*</b>
Периметар епителних ћелија (μм)	35,09±2,24 34,5 (3,1-37,4)	36,91±2,11 37,0 (35,2-38,4)	1,876 (0,064)*
Феретов дијаметар епителних ћелија (μм)	13,51±0,82 13,3 (12,8-14,3)	14,11±1,03 14,2 (13,2-14,8)	1,278 (0,204)*
Обликовани фактор епителних ћелија (1/1)	0,85±0,01 0,9 (0,8-0,9)	0,85±0,04 0,9 (0,8-0,9)	0,376 (0,715)*
Висина епитела (μм)	7,52±0,52 7,4 (7,0-8,1)	8,29±0,79 8,4 (7,7-8,8)	<b>2,158 (0,034)*</b>
Однос Феретовог дијаметра и висине епителних ћелија	0,56±0,02 0,5 (0,5-0,6)	0,59±0,08 0,6 (0,5-0,6)	<b>3,229 (0,004)</b>
Нуклео-цитоплазматски однос (1/1)	0,27±0,03 0,3 (0,2-0,3)	0,28±0,03 0,3 (0,2-0,3)	0,583 (0,562)*
Ареа једара епителних ћелија (μм <sup>2</sup> )	17,05±1,68 17,0 (15,5-18,7)	19,48±2,67 18,8 (17,5-21,3)	<b>2,002 (0,048)*</b>
Периметар једара епителних ћелија (μм)	15,55±0,67 15,4 (15,0-16,2)	16,50±1,14 16,3 (15,7-17,2)	1,831 (0,070)*
Феретов дијаметар једара епителних ћелија (μм)	5,93±0,19 6,0 (5,7-6,1)	6,15±0,41 6,2 (5,9-6,4)	1,182 (0,240)*
Обликовани фактор једара епителних ћелија (1/1)	0,88±0,02 0,9 (0,9-0,9)	0,90±0,02	1,965 (0,052)*

\* Студентов t-тест

\*\* Ман-Витнијев U-тест

У Табелама 10-14 су приказани морфометријски параметри псамоматозних телашаца. За анализу података су коришћени параметријски тест ANOVA и

непараметријски Цонкхир-Терпстра тест. Статистичком обрадом свих узорака хороидних плексуса заједно, нису уочене статистички значајне разлике у морфометријским карактеристикама ПТ између старосних група. Међутим може се уочити тренд повећања укупне арее ПТ и величине појединачних Пт (ареа, периметар, Феретов дијаметар). Она постају више елиптичног облика, што је навероватније последица све већег броја ПТ која настају фузијом два суседна ПТ. Увећавају се и нумеричка и запреминска густина ПТ. Суптилније разлике су потврђене у појединачним групама хороидних плексуса на основу њихове локализације.

Табела 10. Морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца

Старосна група	I	II	III	F (p)
Укупна ареа псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,85±0,53	0,88±0,81	1,20±0,88	2,018 (0,139)*
Ареа псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,08±0,13	0,13±0,17	0,11±0,17	-0,543 (0,587)**
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,61±0,16	0,68±0,16	0,67±0,14	1,729 (0,183)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,23±0,04	0,24±0,06	0,23±0,05	0,274 (0,183)*
Обликовани фактор псамоматозних телашаца (1/1)	1,08±0,06	1,06±0,06	1,06±0,08	1,885 (0,059)**
Нумеричка густина псамоматозних телашаца (1/мм <sup>3</sup> )	12,51±6,97	12,51±9,26	15,89±9,32	1,594 (0,209)*
Запреминска густина псамоматозних телашаца (1/1)	2,96±1,53	3,05±2,69	4,02±2,74	1,846 (0,164)*

\* ANOVA

\*\* Цонкхир-Терпстра тест

У хороидним плексусима обе латералне мождане коморе (Табеле 11 и 12) постоји статистички значајан пораст укупне арее ПТ ( $p < 0,001$ ), као и запреминске густине ПТ ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ ). Осим тога, са десне стране је израженији пораст арее ( $p < 0,05$ ), периметра ( $p < 0,01$ ) и Феретовог дијаметра ПТ ( $p < 0,05$ ) са старењем. С обзиром да пораст нумеричке густин ПТ није статистички значајан, можемо рећи да пре свега расте величина ПТ, док појава нових ПТ није толико изражена.

Табела 11. Морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца у хороидном плексусу леве латералне мождане коморе

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-Г (p) **
Укупна ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	1,23±0,41 1,2 (1,1-1,4)	1,60±0,64 1,6 (1,6-1,8)	1,74±0,32 1,7 (1,4-1,9)	<b>2,698</b> <b>(0,007)**</b>
Ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,05±0,02 0,1 (0,0-0,1)	0,05±0,02 0,0 (0,0-0,0)	0,04±0,00 0,0 (0,0-0,0)	1,904 (0,057)**
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,73±0,11 0,8 (0,7-0,8)	0,71±0,17 0,7 (0,7-0,7)	0,71±0,05 0,7 (0,7-0,7)	1,481 (0,139)**
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,26±0,04 0,3 (0,2-0,3)	0,25±0,06 0,2 (0,2-0,3)	0,24±0,02 0,2 (0,2-0,3)	1,693 (0,090)**
Обликовани фактор псамоматозних телашаца (1/1)	1,07±0,00 1,1 (1,1-1,1)	1,07±0,03 1,1 (1,1-1,1)	1,08±0,12 1,1 (1,0-1,1)	1,481 (0,139)**
Нумеричка густина псамоматозних телашаца (1/мм <sup>3</sup> )	14,07±5,31 13,2 (11,2-13,9)	21,24±10,95 17,5 (12,1-33,6)	21,81±4,06 20,5 (17,6-22,8)	2,362 (0,119)*
Запреминска густина псамоматозних телашаца (1/1)	3,72±1,23 3,8 (3,3-4,6)	5,75±2,60 5,8 (4,9-6,5)	6,20±1,48 6,2 (5,5-7,4)	<b>4,021</b> <b>(0,033)*</b>

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

Табела 12. Морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца у хороидном плексусу десне латералне мождане коморе

Старосна група	I	II	III	F (p)
Укупна ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	1,27±0,33 1,3 (1,2-1,5)	1,28±0,82 1,3 (0,7-1,5)	2,25±0,24 2,3 (2,0-2,4)	<b>8,958</b> <b>(0,002)*</b>
Ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,08±0,13 0,0 (0,0-0,1)	0,22±0,23 0,1 (0,1-0,5)	0,25±0,27 0,1 (0,1-0,6)	<b>2,328</b> <b>(0,020)**</b>
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,55±0,18 0,6 (0,4-0,7)	0,75±0,11 0,8 (0,7-0,8)	0,79±0,06 0,8 (0,7-0,8)	<b>2,804</b> <b>(0,005)**</b>
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,23±0,02 0,2 (0,2-0,2)	0,26±0,03 0,3 (0,3-0,3)	0,27±0,02 0,3 (0,3-0,3)	<b>5,271</b> <b>(0,014)*</b>
Обликовани фактор псамоматозних телашаца (1/1)	1,08±0,05 1,1 (1,0-1,1)	1,06±0,06 1,1 (1,0-1,1)	1,06±0,05 1,1 (1,0-1,1)	1,164 (0,244)**
Нумеричка густина псамоматозних телашаца (1/мм <sup>3</sup> )	17,37±9,67 13,5 (10,9-26,9)	14,03±5,79 14,4 (8,7-17,8)	20,40±4,87 20,5 (16,3-22,9)	1,611 (0,223)*
Запреминска густина псамоматозних телашаца (1/1)	4,21±1,40 4,0 (3,5-5,0)	4,03±2,11 4,2 (2,5-4,8)	6,66±0,51 6,5(6,4-7,1)	<b>7,753</b> <b>(0,003)*</b>

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

У хороидном плексусу 3. мождане коморе (Табела 13) поред пораста укупне арае ПТ ( $p < 0,01$ ), учава се смањење просечне величине појединачних ПТ – арае ( $p < 0,01$ ), периметра ( $p < 0,01$ ) и Феретовог дијаметра ( $p < 0,01$ ), што је вероватно последица

убрзаног стварања нових малих ПТ, на шта указује и пораст нумеричке густине ПТ ( $p < 0,05$ ), нарочито након 70. године живота. Осим тога, утврђен је статистички значајан пораст запреминске густине ПТ ( $p < 0,01$ ), који је најизраженији на прелазу у 3. старосну групу. Занимљиво је да је у 2. старосној групи нижа и запреминска и нумеричка густина него у најмлађој старосној групи, што је вероватно последица мање изражене атрофије хороидног плексуса, у поређењу са најстаријом старосном групом.

Табела 13. Морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца у хороидном плексусу 3. мождане коморе

Старосна група	I	II	III	F (p) *
				J-T (p) **
Укупна ареа псамоматозних телашаца ( $\text{mm}^2$ )	0,43±0,18	0,28±0,16	0,63±0,24	<b>6,152 (0,008)*</b>
Ареа псамоматозних телашаца ( $\text{mm}^2$ )	0,04±0,01	0,04±0,02	0,02±0,00	<b>2,988 (0,003)**</b>
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,65±0,06	0,62±0,17	0,53±0,02	<b>2,931 (0,003)**</b>
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,23±0,02	0,21±0,06	0,19±0,01	<b>2,931 (0,003)**</b>
Обликовани фактор псамоматозних телашаца (1/1)	1,08±0,06	1,09±0,08	1,09±0,05	0,081 (0,922)*
Нумеричка густина псамоматозних телашаца ( $1/\text{mm}^3$ )	9,71±0,45	8,77±5,52	19,21±9,20	<b>2,480 (0,013)**</b>
Запреминска густина псамоматозних телашаца (1/1)	1,87±0,38	1,09±0,68	2,56±1,21	<b>5,950 (0,009)*</b>

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

Резултати за хороидни плексус 4. мождане коморе (Табела 14) Показују да се повећава укупна ареа ПТ ( $p < 0,05$ ), као и нумеричка густина ПТ ( $p < 0,05$ ). За разлику од претходних локализација, промена облика ПТ је најизраженија управо у хороидном плексусу 4. мождане коморе ( $p < 0,05$ ). Највероватније због мале величине само хороидног плексуса, убрзано стварање нових ПТ, на шта указује пораст нумеричке густине ПТ, доводи до фузионисања два или више ПТ, и стварања агрегата неправилног облика.

Табела 14. Морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца у хороидном плексусу 4. мождане коморе

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
Укупна ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,19±0,21	0,19±0,10	0,29±0,19	<b>2,016 (0,044)**</b>
Ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,13±0,14	0,23±0,21	0,18±0,22	0,800 (0,424)**
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,84±,15	0,62±0,19	0,63±0,20	1,395 (0,275)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,17±0,5	0,22±0,07	0,22±0,07	0,994 (0,390)*
Обликовани фактор псамоматозних телашаца (1/1)	1,10±0,12	1,02±0,02	1,00±0,06	<b>2,016 (0,044)**</b>
Нумеричка густина псамоматозних телашаца (1/мм <sup>3</sup> )	3,01±2,45	3,80±1,06	7,22±3,79	<b>4,640 (0,025)*</b>
Запреминска густина псамоматозних телашаца (1/1)	0,66±0,85 <sup>##</sup>	0,77±0,32 <sup>#</sup>	1,57±0,84	2,953 (0,079)*

\* ANOVA

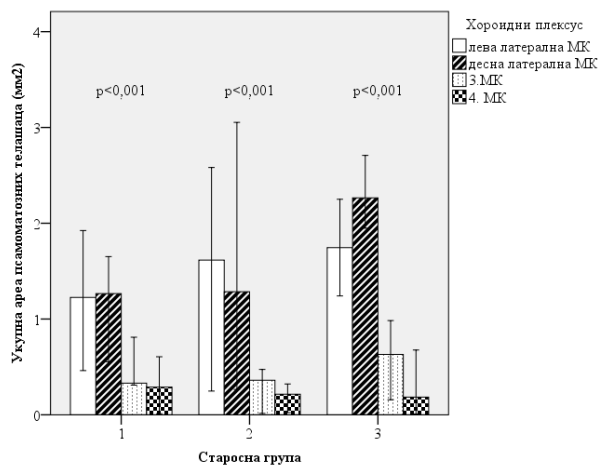
\*\* Џонкхир-Терпстра тест

# p&lt;0,05 (vs. I)

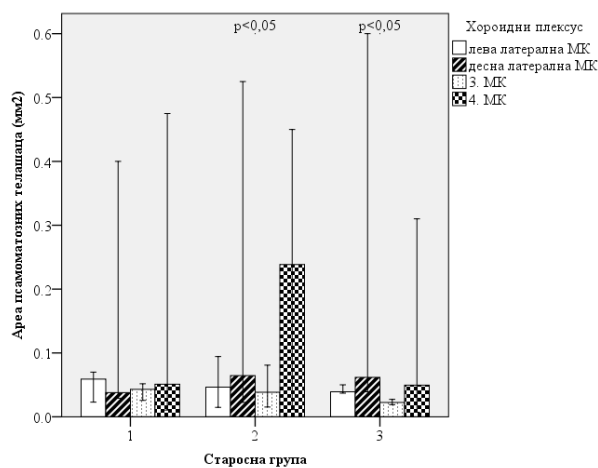
## p&lt;0,01 (vs. I)

На Графиконима 14-20 су приказане упоредне морфометријске карактеристике ПТ у хороидним плексусима са четири различите локализације. Упоређивање је вршено коришћењем параметријске ANOVA анализе или непараметријског Крускал-Валисовог теста. Као што је и очекивано, између ПТ хороидних плексуса леве и десне латералне коморе нису утврђене статистички значајне разлике. Псамоматозна телашца у хороидним плексусима терће и четврте мождане коморе, су била сличних морфометријских карактеристика. Међутим, у појединим старосним групама је постојала статистички значајна разлика у поређењу са ПТ у хороидним плексусима латералних можданих комора. Укупна ара ПТ је била већа у свим старосним групама у ХП латералних МК (p<0,001). Када је у питању ара појединачних ПТ, у средњој и најстаријој старосној групи је постојала статистички значајна разлика (p<0,05), међутим поређењем сваких од парова, није било статистички значајних разлика. Периметар и Феретов дијаметар ПТ су били већи у ХП латералних комора у 1. (p<0,01 и p<0,001) и 3. старосној групи (p<0,001 и p<0,01). Нумеричка (p<0,05, p<0,001 и p<0,001) и запреминска густина ПТ (p<0,001) су у свим старосним групама биле најмање у хороидном плексусу 4. мождане коморе, а највеће у латералним.

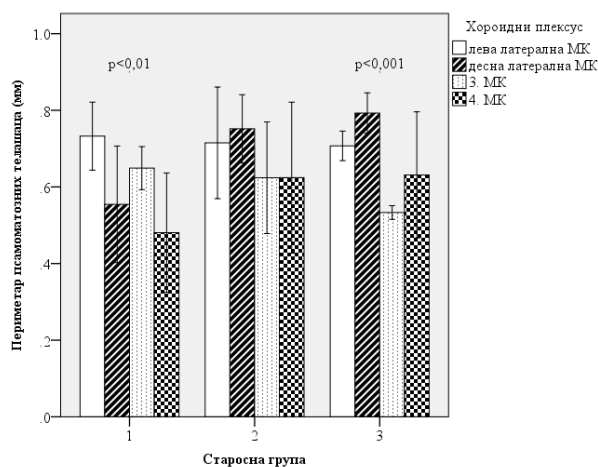




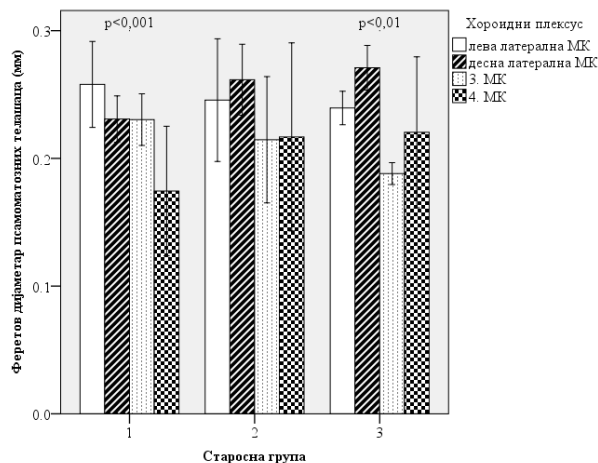
Графикон 13. Медијана укупне арее псамоматозних телашица



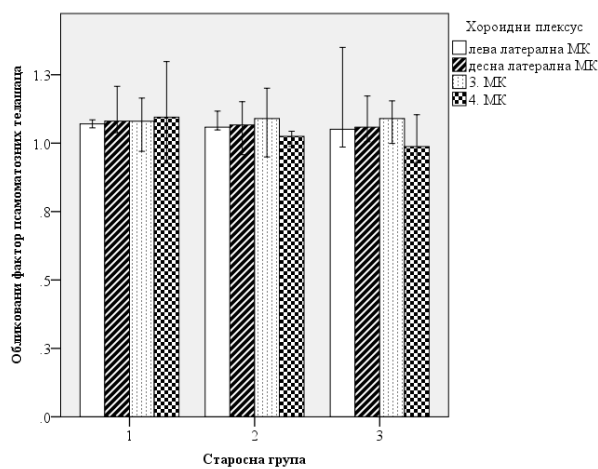
Графикон 14. Медијана арее појединачних псамоматозних телашица



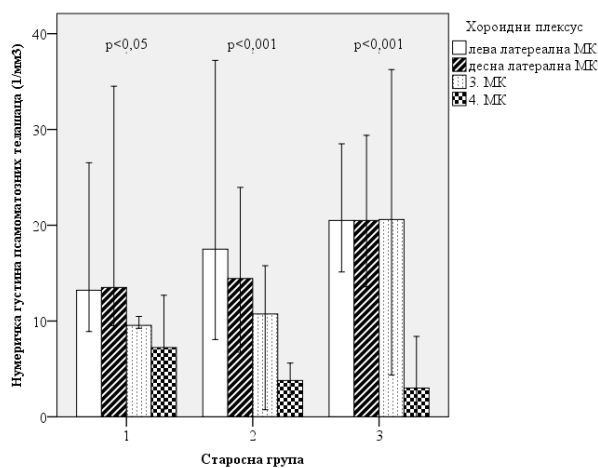
Графикон 15. Просечна вредност периметра псамоматозних телашица



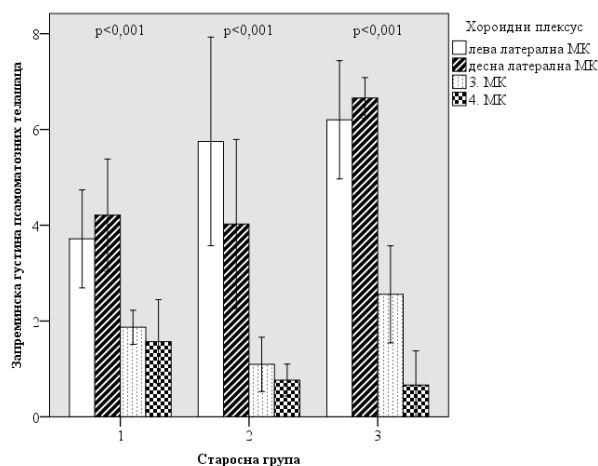
Графикон 16. Просечна вредност Феретовог дијамetra псамоматозних телашица



Графикон 17. Медијана обликованог фактора псамоматозних телашица



Графикон 18. Медијана нумеричке густине псамоматозних телашица



Графикон 19. Просечна запреминска густина псамоматозних телашаца

#### 4.2.3. Утицај морфометријских параметара псамоматозних телашаца, пола и старости на морфометријске карактеристике хороидног плексуса и његовог епитела

Као што је приказано у Табели 15, израчунавањем Пирсоновог коефицијента, уочена је јака негативна корелација са површинском густином хороидног плексуса ( $r=-0,5392$ ,  $p<0,001$ ) и слаба негативна корелација између година старости и запреминске густине крвних судова хороидног плексуса ( $r=-0,282$ ,  $p<0,01$ ) и обликованог фактора епителних ћелија ( $r=0,446$ ,  $p<0,001$ ). Осим тога, постоји средње јака позитивна корелација са периметром епителних ћелија ( $r=0,409$ ,  $p<0,001$ ) и Феретовим дијаметром једара епителних ћелија хороидног плексуса ( $r=0,315$ ,  $p<0,05$ ). Јака позитивна корелација се види између старости и Феретовог дијаметра епителних ћелија ( $r=0,560$ ,  $p<0,001$ ). Ови резултати корелације морфометријских параметара са старошћу, заједно са претходно наведеним резултатима указују да са старошћу долази до смањења запреминске густине крвних судова хороидних плексуса, а да ћелије епитела расту (вероватно и због стварања вакуола и инклузија, нпр. липофусцина), постају елиптичније, односно спљоштеније.

Површинска густина хороидног плексуса је у јакој позитивној корелацији са укупном ара ПТ ( $r=-0,691$ ,  $p<0,001$ ), запреминском густином ПТ ( $r=-0,649$ ,  $p<0,001$ ) и нумеричком густином ПТ ( $r=-0,593$ ,  $p<0,001$ ). Осим тога старост значајно корелира и са свим морфометријским параметрима епитела хороидног плексуса. Јака позитивна

корелација је утврђена са периметром ( $r=0,579$ ,  $p<0,001$ ) и Феретовим дијаметром епителних ћелија ( $r=0,679$ ,  $p<0,001$ ), као и Феретовим дијаметром једара епителних ћелија ( $r=0,536$ ,  $p<0,001$ ). Средње јака позитивна корелација је уочена са следећим параметрима: ареом епителних ћелија ( $r=0,306$ ,  $p<0,01$ ), нуклео-цитоплазматским односом ( $r=0,395$ ,  $p<0,001$ ), ареом ( $r=0,387$ ,  $p<0,001$ ) и периметром једара епителних ћелија ( $r=0,458$ ,  $p<0,001$ ). Јака негативна корелација постоји између старости и обликованог фактора ћелија ( $r=-0,597$ ,  $p<0,001$ ), као и са односом Феретовог дијаметра епителних ћелија и висине епитела ( $r=-0,592$ ,  $p<0,001$ ). Корелација између старости и висине епитела ( $r=-0,293$ ,  $p<0,01$ ) и обликованог фактора једара ( $r=-0,262$ ,  $p<0,01$ ) је слаба негативна.

Површинска густина хороидног плексуса са значајно смањује са порастом већине морфометријских параметара ПТ. Најјача негативна корелација је утврђена са укупном ареом ПТ ( $r=-0,752$ ,  $p<0,001$ ), нумеричком ( $r=-0,721$ ,  $p<0,001$ ) и запреминском густином ПТ ( $r=-0,595$ ,  $p<0,001$ ). Средње јака негативна корелација је уочена са периметром ( $r=-0,316$ ,  $p<0,01$ ) и Феретовим дијаметром ПТ ( $r=-0,309$ ,  $p<0,01$ ). Осим тога, површинска густина хороидног плексуса се је у негативној корелацији са периметром епителних ћелија ( $r=-0,203$ ,  $p<0,05$ ), нуклео-цитоплазматским односом ( $r=-0,395$ ,  $p<0,001$ ), и ареом ( $r=-0,387$ ,  $p<0,001$ ), периметром ( $r=-0,458$ ,  $p<0,001$ ) и Феретовим дијаметром једара епителних ћелија ( $r=-0,536$ ,  $p<0,001$ ).

Запреминска густина крвних судова је, осим са претходно поменутом животном доби, у слабој позитивној корелацији са укупном ареом ПТ ( $r=0,208$ ,  $p<0,05$ ). Осим тога, запреминска густина крвних судова се смањује порастом величине епителних ћелија, периметра ( $r=-0,259$ ,  $p<0,05$ ) и Феретовог дијаметра ( $r=-0,415$ ,  $p<0,001$ ), и њиховим спљоштавањем (обликовани фактор ( $r=0,482$ ,  $p<0,001$ ), висина епитела ( $r=0,361$ ,  $p<0,001$ ), однос Феретовог дијаметра и висине епителних ћелија ( $r=0,492$ ,  $p<0,001$ )), са порастом нуклео-цитоплазматског односа ( $r=-0,261$ ,  $p<0,01$ ), и порастом Феретовог дијаметра једара ( $r=-0,293$ ,  $p<0,01$ ) и њиховим спљоштавањем ( $r=0,284$ ,  $p<0,01$ ).

Псамоматозна телашца са већим периметром се уочавају у узорцима са епителним ћелијама следећих карактеристика: већи нуклео-цитоплазматски однос ( $r=0,296$ ,  $p<0,01$ ), и већа ара ( $r=0,280$ ,  $p<0,01$ ), периметар ( $r=0,240$ ,  $p<0,05$ ) и Фертов дијаметар једара ( $r=0,208$ ,  $p<0,05$ ). Дијаметар ПТ је у слабој позитивној корелацији са

арео једара епителних ћелија ( $r=0,213$ ,  $p<0,05$ ). Запажена је слаба позитивна корелација између нумеричке густине ПТ и нуклео-цитоплазматског односа ( $r=0,241$ ,  $p<0,05$ ).

Табела 15. Међусобна корелација између одређиваних морфометријских параметара хороидног плексуса, као и са старошћу

	Старост (год.)	SvCH (1/мм)	VvBV (1/1)	TApb (1/мм <sup>2</sup> )	Apb (1/мм <sup>2</sup> )	Bpb (1/мм)	Dpb (1/мм)	A/Bpb (1/1)	VVpb (1/1)	NVpb (1/мм <sup>3</sup> )
Старост	r	<b>-0,282</b>	<b>-0,539</b>	0,176	0,053	0,125	0,015	-0,054	0,153	0,172
(год.)	p	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	0,095	0,618	0,238	0,886	0,608	0,148	0,104
SVch	r	<b>-0,282</b>	-0,193	<b>-0,752</b>	-0,009	<b>-0,316</b>	<b>-0,309</b>	-0,022	<b>-0,595</b>	<b>-0,721</b>
(1/мм)	p	<b>0,005</b>	0,060	<b>0,000</b>	0,932	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	0,833	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
VVbv	r	<b>-0,539</b>	-0,193	<b>0,208</b>	-0,105	0,030	0,109	0,103	0,133	0,164
(1/1)	p	<b>0,000</b>	0,060	<b>0,048</b>	0,323	0,775	0,303	0,332	0,208	0,121
Ac	r	<b>0,306</b>	-0,163	-0,034	0,078	0,073	0,085	0,044	-0,067	0,043
(1/мм <sup>2</sup> )	p	<b>0,002</b>	0,113	0,739	0,465	0,490	0,424	0,681	0,526	0,688
Bc (1/мм)	r	<b>0,579</b>	<b>-0,203</b>	<b>-0,259</b>	0,105	-0,050	0,100	-0,007	-0,078	0,080
	p	<b>0,000</b>	<b>0,048</b>	<b>0,011</b>	0,324	0,641	0,346	0,946	0,464	0,450
Dc (1/мм)	r	<b>0,679</b>	-0,098	<b>-0,415</b>	0,047	0,076	0,046	-0,075	-0,150	0,024
	p	<b>0,000</b>	0,342	<b>0,000</b>	0,657	0,475	0,666	0,480	0,156	0,837
A/Bc (1/1)	r	<b>-0,597</b>	0,010	<b>0,482</b>	-0,042	-0,054	0,012	0,126	0,086	-0,049
	p	<b>0,000</b>	0,926	<b>0,000</b>	0,691	0,608	0,908	0,233	0,417	0,767
Hep	r	<b>-0,293</b>	-0,133	<b>0,361</b>	0,037	-0,063	0,034	0,108	0,039	0,002
(1/мм)	p	<b>0,004</b>	0,197	<b>0,000</b>	0,725	0,554	0,752	0,308	0,715	0,986
Dc/Hep		<b>-0,592</b>	-0,038	<b>0,492</b>	-0,011	-0,087	-0,020	0,103	0,101	-0,021
(1/1)		<b>0,000</b>	0,716	<b>0,000</b>	0,918	0,410	0,849	0,331	0,342	0,843
N/C (1/1)	r	<b>0,395</b>	<b>-0,396</b>	<b>-0,261</b>	<b>0,219</b>	0,048	<b>0,296</b>	0,184	-0,141	0,106
	p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,010</b>	<b>0,037</b>	0,653	<b>0,004</b>	0,081	0,183	0,319
An	r	<b>0,387</b>	<b>-0,369</b>	-0,117	0,194	0,058	<b>0,280</b>	<b>0,213</b>	-0,124	0,059
(1/мм <sup>2</sup> )	p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,256	0,066	0,585	<b>0,007</b>	<b>0,043</b>	0,240	0,580
Bn (1/мм)	r	<b>0,458</b>	<b>-0,336</b>	-0,197	0,154	0,134	<b>0,240</b>	0,154	-0,134	0,039
	p	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,055	0,146	0,207	<b>0,022</b>	0,145	0,207	0,713
Dn (1/мм)	r	<b>0,536</b>	<b>-0,251</b>	<b>-0,293</b>	0,104	0,095	<b>0,208</b>	0,095	-0,179	0,024
	p	<b>0,000</b>	<b>0,014</b>	<b>0,004</b>	0,328	0,370	<b>0,048</b>	0,371	0,089	0,822
A/Bn (1/1)	r	<b>-0,262</b>	-0,158	<b>0,284</b>	0,117	-0,186	-0,043	0,079	0,179	0,079
	p	<b>0,010</b>	0,125	<b>0,005</b>	0,270	0,078	0,685	0,455	0,090	0,456

Методом стандардне вишеструке линеарне регресије SVch добијен је статистички значајан модел ( $F=44,625$ ,  $p<0,001$ ) који предвиђа 59,3% варијансе зависне варијабле (Табела 16). Независне варијабле модела су: старост, пол и укупна араа ПТ. Статистички значајан јединствен допринос предикцији зависне променљиве имају све три независне променљиве. Већа укупна араа ПТ, као најзначајнијег фактора, је обрнуто

пропорционална површинској густини хороидног плексуса ( $p < 0,001$ ). Осим тога, површинска густина хороидног плексуса је нижа код старијих особа ( $p < 0,05$ ) и особа мушког пола ( $p < 0,05$ ).

Табела 16. Стандардна вишеструка линеарна регресија површинске густине хороидног плексуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	19.718	1.497		13.175	0.000
Старост	-0.057	0.023	<b>-0.180</b>	-2.540	<b>0.013</b>
Пол	10.378	0.619	<b>0.155</b>	2.226	<b>0.029</b>
Укупна арена ПТ	-4.161	0.398	<b>-0.717</b>	-10.457	<b>0.000</b>

Статистички значајан модел предикције VDbv (Табела 17) као зависне променљиве ( $F=15,178$ ,  $p < 0,001$ ) објашњава 38,7% њене варијансе (Табела 14). Независне променљиве укључене у модел су: старост, укупна арена ПТ, просечна арена ПТ и запреминска густина ПТ. Јединствен допринос предвиђању промене имају три од претходно наведене четири варијабле. Са старењем долази до смањења запреминске густине крвних судова хороидног плексуса ( $p < 0,001$ ), као и са повећањем запреминске густине ПТ ( $p < 0,05$ ). Највећи значај има укупна арена ПТ ( $p < 0,01$ ).

Табела 17. Стандардна вишеструка линеарна регресија запреминске густине крвних судова хороидног плексуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	18.410	1.246		14.780	0.000
Старост	-0.134	0.019	<b>-0.579</b>	-6.893	<b>0.000</b>
Укупна арена ПТ	4.199	1.424	<b>0.993</b>	2.948	<b>0.004</b>
Арена ПТ	-2.860	1.752	-0.139	-1.632	0.106
Запреминска густина ПТ	-0.929	0.449	<b>-0.694</b>	-2.068	<b>0.042</b>

Модели који најбоље објашњава промене арее ( $F=9,726$ ,  $p < 0,01$ ), периметра ( $F=47,335$ ,  $p < 0,001$ ) и Феретовог дијаметра епителних ћелија хороидног плексуса ( $F=80,451$ ,  $p < 0,001$ ) садрже само једну независну варијаблу, односно старост (Табела 18-20). Са старашћу долази до повећања периметра епителних ћелија ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$ , редом). Према овом моделу, око 9,4% варијансе у ареи епителних ћелија

хороидног плексуса зависи од животне доби ( $p < 0,01$ ), скоро трећина варијансе (32,8%) периметра и 45,5% варијансе Феретовог дијаметра епителних ћелија.

Табела 18. Стандардна вишеструка линеарна регресија арее епителних ћелија хороидног плексуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	79.689	4.279		18.625	0.000
Старост	0.211	0.068	<b>0.306</b>	3.119	<b>0.002</b>

Табела 19. Стандардна вишеструка линеарна регресија периметра епителних ћелија хороидног плексуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	31.422	0.805		39.053	0.000
Старост	0.088	0.013	<b>0.579</b>	6.880	<b>0.000</b>

Табела 20. Стандардна вишеструка линеарна регресија Феретовог дијаметра епителних ћелија хороидног плексуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	11.043	0.347		31.821	0.000
Старост	0.049	0.005	<b>0.679</b>	8.969	<b>0.000</b>

Облик епителних ћелија се такође може предвидети на основу неколико независних варијабли (Табела 21). Добијени модел ( $F=21,204$ ,  $p < 0,001$ ) предвиђа укупно 40,2% варијансе облика. Независна варијабла са највећим значајем, и једина са јединственим доприносом моделу, је старост који директно указује на правилност облика ћелија ( $p < 0,001$ ). Са старењем, ћелије постају све неправилнијег облика, односно елиптичног облика. Осим животне доби, модел укључује још две независне варијабле – пол и Феретов дијаметар ПТ.

Табела 21. Стандардна вишеструка линеарна регресија обликованог фактора епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани кофицијенти		Стандардизовани кофицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	0.930	0.024		39.164	0.000
Старост	-0.002	0.000	<b>-0.658</b>	-7.793	<b>0.000</b>
Пол	0.009	0.007	0.116	1.354	0.179
Феретов дијаметар ПТ	0.131	0.069	0.157	1.890	0.062

Слично као у претходном случају, и у моделу који предвиђа промене висине епителних ћелија ( $F=6,940$ ,  $p<0,001$ ), старост, пол и Феретов дијаметар ПТ објашњавају 16,5% варијансе зависне променљиве (Табела 22). Са старошћу, смаује се висина епитела хороидног плекуса ( $p<0,001$ ).

Табела 22. Стандардна вишеструка линеарна регресија обликованог фактора епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани кофицијенти		Стандардизовани кофицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	8.805	0.537		16.389	0.000
Старост	-0.024	0.006	<b>-0.434</b>	-4.355	<b>0.000</b>
Пол	0.298	0.158	0.191	1.881	0.063
Феретов дијаметар ПТ	2.380	1.573	0.148	1.514	0.134

Модел ( $F=17,478$ ,  $p<0,001$ ) који објашњава 42,3% промена у односу висине и Феретовог дијаметра епителних ћелија хороидног плекуса, који указује на спљоштавање или издуживање епителним ћелијама са старењем, садржи четири независне варијабле: старост, пол, и периметар и Феретов дијаметар ПТ (Табела 23). Најзначајнија променљива је старост – са годинама живота долази до спљоштавања епителних ћелија ( $p<0,001$ ).



Табела 23. Стандардна вишеструка линеарна односа висине и Феретовог дијаметра епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани		Стандардизова	t	p
	кофицијенти		ни		
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	0.739	0.046		16.127	0.000
Старост	0.004	0.000	<b>-0.644</b>	-7.373	<b>0.000</b>
Пол	0.019	0.014	0.119	1.388	0.169
Периметар ПТ	-0.131	0.110	-0.255	-1.191	0.237
Феретов дијаметар ПТ	0.598	0.342	0.368	1.752	0.083

Методом стандардне вишеструке регресије је развијен статистички значајан модел ( $F=12,912$ ,  $p<0,001$ ) који објашњава 28,4% варијансе нуклео-цитоплазматског односа, као зависне променљиве (Табела 24). Модел су сачињавале три независне варијабле, старост, пола и периметар ПТ, од којих је свака имала јединствен допринос моделу. Највећи значај има животна доб, која је директно пропорционална нуклео-цитоплазматском односу епителних ћелија хороидног плекуса ( $p<0,001$ ). Осим код старијих особа, овај однос је већи код мушкараца ( $p<0,01$ ) и у узорцима са ПТ већег периметра ( $p<0,05$ ).

Табела 24. Стандардна вишеструка линеарна нуклео-цитоплазматског односа епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани		Стандардизовани	t	p
	кофицијенти		кофицијенти		
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	0.210	0.019		11.115	0.000
Старост	0.001	0.000	<b>0.474</b>	5.049	<b>0.000</b>
Пол	-0.018	0.006	<b>-0.273</b>	-2.876	<b>0.005</b>
Периметар ПТ	0.038	0.019	<b>0.184</b>	1.984	<b>0.050</b>

Статистички значајни модели арее ( $F=9,862$ ,  $p<0,001$ ) и периметра једара епителних ћелија ( $F=12,559$ ,  $p<0,001$ ) садрже две независне променљиве, старост и периметар ПТ (Табеле 25 и 26) и објашњавају 16,5%, односно 20,4% варијансе зависне варијабле. Ареа и периметар једара су већи код старијих особа ( $p<0,001$ ) са околним ПТ већег периметра ( $p<0,05$ ).

Табела 25. Стандардна вишеструка линеарна арее једара епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	12.917	1.508		8.567	0.000
Старост	0.062	0.019	<b>0.326</b>	3.355	<b>0.001</b>
Периметар ПТ	4.128	1.672	<b>0.240</b>	2.468	<b>0.016</b>

Табела 26. Стандардна вишеструка линеарна регресија периметра једара епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	13.517	0.630		21.470	0.000
Старост	0.033	0.008	<b>0.409</b>	4.313	<b>0.000</b>
Периметар ПТ	1.392	0.698	<b>0.189</b>	1.993	<b>0.049</b>

Поред старости која се показала као значајна вариблa у предвиђању промена у периметру нуклеуса, модел са Феретовим дијаметром нуклеуса као зависном варијаблом ( $F=21,632$ ,  $p<0,001$ ), је укључивао и пол (Табела 27). Комбинација ова два фактора објашњава 30,3% варијансе зависне променљиве. Самосталан допринос имају обе променљиве у моделу. Године старости су директно пропорционалне Феретевом дијаметру једара ( $p<0,001$ ). Такође, Феретов дијаметар једара је мањи код особа женског пола ( $p<0,05$ ).

Табела 18. Стандардна вишеструка линеарна регресија Феретовог дијаметра једара епителних ћелија хороидног плекуса

Модел	Нестандардизовани коефицијенти		Стандардизовани коефицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	5.333	0.165		32.252	0.000
Старост	0.017	0.003	<b>0.588</b>	6.576	<b>0.000</b>
Пол	-0.145	0.071	<b>-0.182</b>	-2.030	<b>0.045</b>

Методом стандардне вишеструке линеарне регресије, покушали смо да добијемо модел који би објаснио разлику у облику једара епителних ћелија хороидног плекуса, односно морфометријског параметра који то објашњава – обликованог фактора ( $F=5,242$ ,  $p<0,05$ ). Старост, ареа, периметар и Феретов дијаметар ПТ објашњавају укупно 15,9% варијансе, а свака од варијабли је имала јединствен допринос. Најзначајније су периметар ( $p<0,05$ ) и Феретов дијаметар ПТ ( $p<0,05$ ). Једра су правилнијег облика, више

округла, када су присутна ПТ већег Феретовог дијаметра, а мањег периметра, односно када су и ПТ правилнијег облика. Осим тога, округлија једра су чешће присутна код млађих особа ( $p < 0,05$ ) са ПТ мање арее ( $p < 0,05$ ).

*Табела 19. Стандардна вишеструка линеарна регресија видине епитела хороидног плекуса*

Модел	Нестандардизовани кофицијенти		Стандардизовани кофицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	0.914	0.012		74.414	0.000
Старост	0.000	0.000	<b>-0.255</b>	-2.530	<b>0.013</b>
Ареа ПТ	0-.023	0.012	<b>-0.194</b>	-1.986	<b>0.050</b>
Периметар ПТ	-0.071	0.031	<b>-0.583</b>	-2.283	<b>0.025</b>
Феретов дијаметар ПТ	0.248	0.099	<b>0.641</b>	2.519	<b>0.014</b>

#### *4.2.4. Морфометријска анализа псамотозних телаца у односу на имунопозитивност реакције на остеопонтин*

С обзиром да је на хистохемијским препаратима уочено да је стварање ПТ израженије у хороидним плексусима латералних комора, у односу на трећу и четврту комору, имунохистохемијска анализа је урађена само на узорцима узетим из латералних можданих комора. Како нису утврђене статистички значајне разлике у одређиваним параметрима ПТ између хороидних плекуса леве и десне латералне мождане коморе (Табела 20), у даљој анализи су збирно посматрани узорци из обе коморе.

Табела 20. Процентуални удео и морфометријске карактеристике ПТ у односу на позитивност реакције на остеопоптин у хороидним плексусима леве и десне латералне мождане коморе

Хороидни плексус латералних можданих комора	лева	десна	t(p) * Z (p) **
Псамоматозна телашца позитивна на остеопоптин			
Укупан број (N)	31,00±28,05 25,0 (12,8-56,2)	42,47±31,47 38,0 (24,8-54,2)	1,266 (0,206)**
Процентуални удео (%)	40,90±22,19 45,1 (28,6-68,7)	47,36±21,26 50,8 (36,2-67,8)	0,815 (0,422)*
Укупна ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	1,05±0,87 0,9 (0,4-2,3)	1,48±1,28 1,3 (0,8-2,7)	1,576 (0,126)*
Ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,02 0,03 (0,02-0,05)	0,04±0,02 0,03 (0,03-0,05)	0,850 (0,395)**
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,60±0,14 0,6 (0,5-0,7)	0,65±0,16 0,6 (0,5-0,8)	0,896 (0,378)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,21±0,05 0,2 (0,2-0,2)	0,22±0,05 0,2 (0,2-0,3)	0,936 (0,357)*
Псамоматозна телашца негативна на остеопоптин			
Укупан број (N)	49,47±35,31 46,0 (13,0-79,0)	45,93±26,70 40,0 (30,0-59,0)	0,309 (0,760)*
Процентуални удео (%)	59,10±22,19 59,1 (42,3-76,0)	52,64±21,26 50,0 (33,1-67,0)	0,815 (0,422)*
Укупна ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	1,97±1,63 1,6 (0,7-3,0)	1,53±1,09 1,2 (0,8-2,1)	0,767 (0,443)**
Ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,01 0,03 (0,02-0,04)	0,03±0,01 0,03 (0,03-0,04)	0,372 (0,712)*
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,59±0,13 0,6 (0,5-0,7)	0,61±0,09 0,6 (0,5-0,7)	0,334 (0,741)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,21±0,04 0,2 (0,2-0,2)	0,21±0,03 0,2 (0,2-0,2)	0,380 (0,707)*

\* Студентов t-тест

\*\* Ман-Витнијев U-тест

У Табели 21 је приказан апсолутан број ПТ са позитивном, односно негативном имуном реакцијом на остеопоптин, по старосним групама. Применом  $\chi^2$ -теста независности, утврђено је да су у најмлађој старосној групи доминирала ПТ са позитивном реакцијом, за разлику од 2. и 3. старосне групе ( $\chi^2=199,852$ ,  $p<0,001$ ). Између узрока средње и старије животне доби, није било статистички значајне разлике ( $\chi^2=1,115$ ,  $p=0,291$ ).

Табела 21. Удео псамоматозних телашаца са позитивном, односно негативном имуном реакцијом на остеопонтин, по старосним групама

Старосна група	I	II	III	$\chi^2$ (p)
Позитивна (N (%))	516 (63,8%)	243 (35,5%%)	343 (33,0%%)	<b>199,852 (0,000)</b>
Негативна (N (%))	293 (36,2%)	442 (64,5%)	696 (67,0%)	

Упоредне морфометријске карактеристике ПТ са позитивном и негативном реакцијом на остеопонтин су дате у Табели 22. Осим што је укупна ареа имунопозитивних ПТ на остеопонтин знатно већа ( $p < 0,05$ ), морфометријски параметри појединачних ПТ се нису разликовали.

Табела 20. Упоредне морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца са позитивном и негативном реакцијом на остеопонтин

Имуна реакција псамоматозних телашаца на остеопонтин	позитивна	негативна	t(p) * Z (p) **
Укупна ареа псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	1,48±1,10 0,9 (0,5-2,3)	3,36±2,09 1,4 (0,8-2,8)	<b>1,980 (0,048)**</b>
Ареа псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,04±0,02 0,0 (0,0-0,0)	0,04±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,283 (0,777)**
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,68±0,16 0,6 (0,5-0,7)	0,71±0,10 0,6 (0,5-0,7)	0,294 (0,774)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,24±0,06 0,2 (0,2-0,2)	0,25±0,03 0,2 (0,2-0,2)	0,244 (0,812)*

\* Студентов t-тест

\*\* Ман-Витнијев U-тест

Применом ANOVA анализе, односно Џонкхир-Терпстра теста анализирани су разлике у броју и морфометријским карактеристикама имунопозитивних и имунонегативних ПТ по старосним групама (Табела 23). Са старашћу долази до пораста апсолутног броја имуноп ПТ ( $p < 0,01$ ), али не и имунопозитивних ПТ ( $p = 0,543$ ). Међутим ако се посматрају релативни бројеви, односно процентуални удео имунопозитивности, замена доминације имунопозитивних ПТ имунонегативним ПТ се дешава након 50. године живота ( $p < 0,01$ ). Осим тога, у старијим старосним групама, већа је укупна ареа имунонегативних ПТ ( $p < 0,01$ ). као и њихов периметар ( $p < 0,05$ ) и Феретов дијаметар ( $p < 0,05$ ). Све ово указује на уградњу остеопонтин у ламеле ПТ у млађој животной доби, пре 50. године, те су, вероватно, имунопозитивна ПТ у средњој и старосној групи, ПТ створена у младости.

Табела 23. Процентуални удео и морфометријске карактеристике ПТ у односу на позитивност реакције на остеопонтин по старосним групама

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
<b>Псамоматозна телашца позитивна на остеопонтин</b>				
Укупан број (N)	51,60±40,83 37,0 (17,8-95,2)	24,30±19,57 27,0 (8,2-45,8)	23,30±20,00 42,0 (23,2-62,5)	0,609 (0,543)**
Процентуални удео (%)	62,26±15,75 67,4 (50,0-75,8)	34,93±16,93 42,9 (19,2-50,8)	35,21±20,53 46,4 (24,0-71,9)	<b>7,732</b> <b>(0,002)*</b>
Укупна ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	1,63±1,36 1,4 (0,4-2,6)	0,99±0,86 1,0 (0,3-1,6)	1,48±1,10 1,5 (0,8-2,8)	0,889 (0,423)*
Ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,02 0,0 (0,0-0,0)	0,04±0,02 0,0 (0,0-0,1)	1,445 (0,148)**
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,59±0,13 0,6 (0,5-0,7)	0,59±0,14 0,6 (0,5-0,7)	0,59±0,16 0,6 (0,6-0,8)	1,359 (0,274)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,20±0,04 0,2 (0,2-0,3)	0,21±0,05 0,2 (0,2-0,2)	0,24±0,06 0,2 (0,2-0,3)	1,564 (0,228)*
<b>Псамоматозна телашца негативна на остеопонтин</b>				
Укупан број (N)	29,30±17,10 32,5 (8,5-44,2)	44,20±29,09 39,5 (25,0-65,8)	69,60±31,58 69,0 (43,8-91,8)	<b>5,832</b> <b>(0,008)*</b>
Процентуални удео (%)	37,74±15,75 32,6 (24,2-50,0)	65,07±16,93 60,9 (50,6-84,7)	64,79±20,53 67,5 (44,9-79,1)	<b>7,732</b> <b>(0,010)*</b>
Укупна ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,82±0,60 0,9 (0,01-1,2)	1,82±1,21 1,7 (0,8-2,5)	2,60±1,59 2,8 (1,4-3,1)	<b>3,042</b> <b>(0,002)**</b>
Ара псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,04±0,01 0,0 (0,0-0,0)	3,166 (0,058)*
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,53±0,13 0,5 (0,4-0,6)	0,62±0,01 0,6 (0,6-0,7)	0,65±0,01 0,6 (0,6-0,7)	<b>3,732</b> <b>(0,037)*</b>
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,19±0,04 0,2 (0,2-0,2)	0,22±0,02 0,2 (0,2-0,2)	0,22±0,03 0,2 (0,2-0,2)	<b>4,281</b> <b>(0,024)*</b>

\* ANOVA

\*\* Донкхир-Терпстра тест

Методом бинарне логистичке регресије утврђено је да су имунопозитивна ПТ веће арее ( $p < 0,05$ ) и мањег Феретовог дијаметра ( $p < 0,05$ ), самим тим правилнијег, округлог, облика. Добијени модел ( $\chi^2 = 6,908$ ,  $p < 0,05$ ) објашњава 10,9-14,5% варијансе имунопозитивности ПТ као зависне варијабле (Табела 24).

Табела 24. Бинарна логистичка регресија имунопозитивности псамоматозних телашаца на остеоопонтин

Модел	B	SE	Wald	p	HR
Ареа појединачних ПТ	0,000	0,000	4,159	<b>0,041</b>	1,000
Феретов дијаметар појединачних ПТ	-0,073	0,037	4,038	<b>0,044</b>	0,929
Константа	7,632	4,045	3,560	<b>0,059</b>	2062,466

Методом стандардне вишеструке регресије је развијен модел предвиђања удела имунопозитивних ПТ на остеоопонтин ( $F=11,047$ ,  $p<0,001$ ), на основу морфометријских параметара хороидног плексуса, његовог епитела, као и самих ПТ (Табела 25). Укупно 13 различитих независних варијабли је укључено, при чему објашњавају чак 82,9% варијансе зависне променљиве, а и свака од њих има јединствен допринос. Имунопозитивност се смањује са старошћу ( $p<0,01$ ). Међутим, много већи значај имају саме морфометријске карактеристике ПТ и епитела ХП. Удео имунопозитивних ПТ је већи када је мања просечна ареа појединачних ПТ ( $p<0,001$ ), а већи њихов периметар ( $p<0,01$ ) и када су ПТ правилнијег облика ( $p<0,01$ ). Такође, процентуални удео ПТ са позитивном имуном реакцијом на остеоопонтин је обрнуто пропорционалан нумеричкој густини ПТ ( $p<0,001$ ). Ово су све карактеристике ПТ у млађој животној доби, као што и морфометријске карактеристике епитела ХП код млађих предвиђају већу имунопозитивност ПТ: епителне ћелије ХП правилнијег облика ( $p<0,01$ ), мање арее ( $p<0,001$ ), а већег Феретовог дијаметра ( $p<0,01$ ), мањи нуклео-цитоплазматски однос ( $p<0,05$ ), издужена једра епителних ћелија ХП ( $p<0,001$ ), веће арее ( $p<0,001$ ) и мањег Феретовог дијаметра ( $p<0,001$ ).

Табела 25. Стандардна вишеструка линеарна регресија удела имунопозитивних ПТ на остеоопонтин

Модел	Нестандардизовани коэффицијенти		Стандардизовани коэффицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	5,395	4,892		1,103	0,288
Старост	-0,006	0,002	<b>-0,397</b>	-3,204	<b>0,006</b>
Укупна арца ПТ	0,246	0,062	<b>0,805</b>	3,966	<b>0,001</b>
Арца појединачних ПТ	-40,164	10,258	<b>-2,964</b>	-3,915	<b>0,001</b>
Периметар ПТ	3,772	1,266	<b>2,239</b>	2,979	<b>0,009</b>
Обликовани фактор ПТ	4,536	0,668	<b>1,144</b>	6,785	<b>0,000</b>
Нумеричка густина ПТ	-0,020	0,004	<b>-0,859</b>	-4,785	<b>0,000</b>
Запреминска густина крвних судова	-0,017	0,006	<b>-0,333</b>	-2,931	<b>0,010</b>
Арца епителних ћелија ХП	-0,071	0,018	<b>-3,745</b>	-3,941	<b>0,001</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ХП	0,688	0,221	<b>2,983</b>	3,111	<b>0,007</b>
Обликовани фактор епителних ћелија ХП	12,756	4,170	<b>2,398</b>	3,059	<b>0,008</b>
Арца једара епителних ћелија	0,422	0,064	<b>5,964</b>	6,596	<b>0,000</b>
Обликовани фактор једара епителних ћелија	-2,110	0,418	<b>-4,015</b>	-5,048	<b>0,000</b>
Нуклео-цитоплазматски однос	-19,023	4,095	<b>-1,317</b>	-4,646	<b>0,000</b>

#### 4.2.5. Морфометријска анализа псамомотозних телашица у односу на имунопозитивност реакције на остеокалцин

Као и у случају имунохистохемијског бојења на остеоопонтин, ПТ су сматрана имунопозитивним ако је пребојеност била већа од 50%. Утврђен је апсолутни и релативни број имунопозитивних и имунонегативних ПТ, као и морфометријски параметри за сваки ПТ. С обзиром да није утврђена статистички значајна разлика између одређиваних променљивих између узорак хороидних плексуса из леве и десне



латералне мождане коморе (Табела 26), у наредним резултатима сви ови узорци анализирани заједно.

*Табела 26. Процентуални удео и морфометријске карактеристике ПТ у односу на позитивност реакције на остеокалцин у хороидним плексусима леве и десне латералне мождане коморе*

Хороидни плексус латералних можданих комора	лева	десна	t(p) * Z (p) **
Псамоматозна телашца позитивна на остеокалцин			
Укупан број (N)	14,21±14,02 16,0 (1,5-35,5)	21,07±16,88 15,0 (10,0-40,0)	1,334 (0,182)**
Процентуални удео (%)	15,24±9,56 18,5 (10,5-26,8)	22,00±11,68 25,0 (12,0-39,4)	1,675 (0,106)*
Укупна ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,49±0,56 0,7 (0,0-1,5)	0,67±0,58 0,8 (0,2-1,5)	0,829 (0,415)*
Ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,02±0,02 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	1,367 (0,183)*
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,47±0,24 0,6 (0,4-0,7)	0,58±0,15 0,6 (0,5-0,7)	1,241 (0,198)**
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,17±0,09 0,2 (0,1-0,2)	0,21±0,05 0,2 (0,2-0,2)	1,057 (0,291)**
Псамоматозна телашца негативна на остеокалцин			
Укупан број (N)	66,21±46,10 55,5 (17,5-116,8)	79,79±42,93 81,5 (42,8-110,0)	0,806 (0,427)*
Процентуални удео (%)	84,76±9,56 82,2 (76,8-95,6)	78,00±11,68 76,5 (69,0-89,4)	1,675 (0,106)*
Укупна ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	2,04±1,21 2,1 (1,1-3,7)	2,50±1,21 2,7 (1,0-3,8)	1,011 (0,312)**
Ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,683 (0,501)*
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,56±0,11 0,6 (0,5-0,6)	0,59±0,10 0,6 (0,5-0,7)	0,744 (0,463)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,20±0,04 0,2 (0,2-0,2)	0,21±0,03 0,2 (0,2-0,2)	0,799 (0,431)*

\* Студентов t-тест

\*\* Ман-Витнијев U-тест

У Табели 27 су дати апсолутни релативни број ПТ позитивних на имунохистохемијско бојење на остеокалцин, односу број негативних ПТ, кроз све три старосне групе. Са старењем долази до постепеног повећања имунопозитивности ПТ на остеокалцин ( $\chi^2=67,182$ ,  $p<0,001$ ). Постоји статистички значајна разлика у односу позитивних и негативних ПТ на прелазу из најмлађе у средњу старосну групу, након 50.

године живота ( $\chi^2=9,094$ ,  $p<0,01$ ), као и на прелазу у најстарију старосну групу, након 70. године живота ( $\chi^2=21,354$ ,  $p<0,001$ ).

Табела 27. Удео псамоматозних телашаца са позитивном, односно негативном имуном реакцијом на остеокалцин, по старосним групама

Старосна група	I	II	III	$\chi^2$ (p)
Позитивна (N (%))	79 (11,2%)	120 (16,9%)	295 (26,3%)	<b>67,182 (0,000)</b>
Негативна (N (%))	627 (88,8%)	590 (83,1%)	827 (73,7%)	

Упоредне морфометријске карактеристике ПТ са позитивном и негативном реакцијом на остеокалцин су дате у Табели 28. Осим што је укупна ара имунопозитивних ПТ на остеокалцин знатно већа ( $p<0,001$ ), и појединачна имунопозитивна ПТ су имала већу ареу од имунонегативних ПТ ( $p<0,001$ ).

Табела 28. Упоредне морфометријске карактеристике псамоматозних телашаца са позитивном и негативном реакцијом на остеокалцин

Имуна реакција псамоматозних телашаца на остеокалцин	позитивна	негативна	t(p) * Z (p) **
Укупна ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,58±0,57 0,4 (0,1-0,9)	2,27±1,50 2,4 (0,7-3,7)	<b>6,242 (0,000)*</b>
Ара псамоматозних телашаца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,02 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	<b>21,298 (0,000)*</b>
Периметар псамоматозних телашаца (мм)	0,52±0,21 0,5 (0,4-0,7)	0,28±0,10 0,6 (0,5-0,6)	0,672 (0,502)**
Феретов дијаметар псамоматозних телашаца (мм)	0,19±0,07 0,2 (0,2-0,2)	0,20±0,04 0,2 (0,2-0,2)	0,623 (0,533)**

\* Студентов t-тест

\*\* Ман-Витнијев U-тест

Применом ANOVA анализе, односно Џонкхир-Терпстра теста анализирани су ралике у броју и морфометријским карактеристикама имунопозитивних и имунонегативних ПТ по старосним групама (Табела 29). Са старошћу долази до пораста апсолутног броја имунопозитивних ПТ ( $p<0,001$ ), али не и имунопозитивних ПТ ( $p=0,617$ ), што указује да се у старијој животној доби у све новонастале ПТ уграђује остеокалцин. Међутим ако се посматрају релативни бројеви, односно процентуални удео имунопозитивности, доминација имунопозитивности ПТ на остеокалцин наступа постепено из једне у другу старосну групу, равномерно током процеса старења ( $p<0,01$ ). Осим тога, долази до постепеног пораста укупне арее ПТ позитивних на имунохистохемијско бојење специфичним антителима за остеокалцин ( $p<0,01$ )- Што се тиче укупне арее имунонегативних ПТ, она се нити смањује нити повећава, што, такође,

иде у прилог тези да су сва имунонегативна ПТ уочена у узорцима старије животне доби, вероватно настала у младости. За разлику од остеопонтин, остеокалцин се пре свега експримира централно, што додатно потврђује претходно изнете резултате морфометријске анализе. Пораст периметра ( $p < 0,05$ ) и Феретовог дијаметра ПТ ( $p < 0,05$ ) који су класификовани као имунопозитивни на остеокалцин, је најизраженији на прелазу из најмлађе у средњу старосну групу, односно после 50, године живота.

Табела 29. Процентуални удео и морфометријске карактеристике ПТ у односу на позитивност реакције на остеокалцин по старосним групама

Старосна група	I	II	III	F (p) * J-T (p) **
Псамоматозна телашца позитивна на остеопонтин				
Укупан број (N)	7,90±9,92 6,5 (0,8-11,2)	15,00±1,01 20,5 (4,5-51,2)	19,50±16,47 33,5 (15,5-53,8)	<b>3,464</b> <b>(0,001)**</b>
Процентуални удео (%)	10,64±10,33 7,6 (1,4-18,8)	18,67±5,66 21,8 (15,1-37,7)	26,55±9,62 32,1 (22,0-66,7)	<b>7,839</b> <b>(0,002)*</b>
Укупна ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,16±0,25 0,1 (0,0-0,2)	0,64±0,64 0,8 (0,2-2,1)	0,95±0,48 1,1 (0,7-1,9)	<b>7,182</b> <b>(0,003)*</b>
Ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,02±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,02 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	<b>5,433</b> <b>(0,003)*</b>
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,38±0,23 0,4 (0,2-0,6)	0,59±0,18 0,7 (0,4-0,7)	0,62±0,10 0,6 (0,5-0,7)	<b>2,237</b> <b>(0,025)**</b>
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,13±0,08 0,1 (0,1-0,2)	0,21±0,06 0,2 (0,2-0,3)	0,22±0,04 0,2 (0,2-0,2)	<b>2,237</b> <b>(0,025)**</b>
Псамоматозна телашца негативна на остеопонтин				
Укупан број (N)	62,70±46,14 54,5 (24,8-200,6)	73,75±52,80 92,0 (15,2-121,2)	82,70±36,80 75,5 (50,5-116,8)	0,493 (0,617)*
Процентуални удео (%)	89,36±10,33 92,4 (81,2-98,6)	81,33±5,66 81,9 (75,2-86,2)	73,45±9,62 74,0 (65,1-81,6)	<b>7,839</b> <b>(0,002)*</b>
Укупна ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	1,73±1,57 1,2 (0,5-2,7)	2,46±1,85 3,3 (0,4-4,0)	2,67±1,04 2,7 (1,8-3,8)	1,266 (0,206)**
Ареа псамоматозних телашца (мм <sup>2</sup> )	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	0,03±0,01 0,0 (0,0-0,0)	1,800 (0,186)*
Периметар псамоматозних телашца (мм)	0,53±0,11 0,5 (0,4-0,6)	0,57±0,11 0,6 (0,5-0,6)	0,62±0,07 0,6 (0,6-0,7)	2,405 (0,111)*
Феретов дијаметар псамоматозних телашца (мм)	0,19±0,04 0,2 (0,1-0,2)	0,20±0,04 0,2 (0,2-0,2)	0,22±0,02 0,2 (0,2-0,2)	2,657 (0,090)*

\* ANOVA

\*\* Џонкхир-Терпстра тест

Методом стандардне вишеструке регресије је развијен модел предвиђања удела имунопозитивних ПТ на остеокалцин ( $F=14,121$ ,  $p < 0,001$ ), на основу морфометријских

параметара хороидног плексуса, његовог епитела, као и самих ПТ (Табела 30). Укупно 12 различитих независних варијабли је укључено, при чему објашњавају чак 78,5% варијансе зависне променљиве, а и свака од њих има јединствен допринос. Имунопозитивност се повећава са старашћу ( $p < 0,01$ ). Међутим, много већи значај имају саме морфометријске карактеристике ПТ и епитела ХП. Удео имунопозитивних ПТ је већи када је већа просечна ареа појединачних ПТ ( $p < 0,001$ ) и њихов Феретов дијаметар ( $p < 0,01$ ), а мањи периметар ( $p < 0,001$ ). Такође, процентуални удео ПТ са позитивном имуном реакцијом на остеокалцин је обрнуто пропорционалан ареи епителних ћелија ( $p < 0,001$ ), нуклео-цитоплазматском односу ( $p < 0,001$ ) и периметру једара епителних ћелија ( $p < 0,01$ ). Имунопозитивност је израженија када су епителне ћелије ХП већег периметра ( $p < 0,001$ ) и Феретовог дијаметра ( $p < 0,01$ ), као и правилнијег облика ( $p < 0,001$ ), а њихова једра веће арее ( $p < 0,001$ ).

Табела 30. Стандардна вишеструка линеарна регресија удела имунопозитивних ПТ на остеокалцин

Модел	Нестандардизовани кофицијенти		Стандардизовани кофицијенти	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
Константа	5,395	4,892		1,103	0,288
Старост	-0,006	0,002	<b>-0,397</b>	-3,204	<b>0,006</b>
Укупна арца ПТ	0,246	0,062	<b>0,805</b>	3,966	<b>0,001</b>
Арца појединачних ПТ	-40,164	10,258	<b>-2,964</b>	-3,915	<b>0,001</b>
Периметар ПТ	3,772	1,266	<b>2,239</b>	2,979	<b>0,009</b>
Обликовани фактор ПТ	4,536	0,668	<b>1,144</b>	6,785	<b>0,000</b>
Нумеричка густина ПТ	-0,020	0,004	<b>-0,859</b>	-4,785	<b>0,000</b>
Запреминска густина крвних судова	-0,017	0,006	<b>-0,333</b>	-2,931	<b>0,010</b>
Арца епителних ћелија ХП	-0,071	0,018	<b>-3,745</b>	-3,941	<b>0,001</b>
Феретов дијаметар епителних ћелија ХП	0,688	0,221	<b>2,983</b>	3,111	<b>0,007</b>
Обликовани фактор епителних ћелија ХП	12,756	4,170	<b>2,398</b>	3,059	<b>0,008</b>
Арца једара епителних ћелија	0,422	0,064	<b>5,964</b>	6,596	<b>0,000</b>
Обликовани фактор једара епителних ћелија	-2,110	0,418	<b>-4,015</b>	-5,048	<b>0,000</b>
Нуклео-цитоплазматски однос	-19,023	4,095	<b>-1,317</b>	-4,646	<b>0,000</b>



## 5. ДИСКУСИЈА

Хороидни плексуси су структуре јединствене по својој морфологији и функцији, то су папилолике, разгранате и лобулисане, високоваскуларизоване формације смештене у дубини сваке од четири можданих комора. Њихова физички тешка доступност и ограничен приступ узорцима здравих ХП представљале су важне потешкоће у научно-истраживачкој и стручној анализи ХП. Вероватно је и то један од разлога који доприноси објашњењу зашто је број студија које су се бавиле истраживањем ХП заправо несразмерно мали у односу на целокупну истраживачку активност. Жива анатомија ХП је далеко информативнија од оне која је доступна на кадаверима, када је цереброспинална течност у потпуности издренирана. Тада се хороидни плексуси виде као смежуране структуре не веће од кажипрста, како се протежу дуж пода бочних можданих комора, виси са крова треће комора и прекрива попут тепиха кров четврте мождане коморе. Представе о морфологији и функцији ХП добијене проучавањем искључиво аутопсијских случајева доводиле су до заблуда и погрешних закључака. Тако се сматрало да ХП имају превише малу површину да би били од неког већег значаја за функцију ЦНС-а. Међутим, онда је откривено да епител ХП поседује четкасти покров на својој апикалној, вентрикуларној површини, те да бројни микровили и цилије који препокривају апикални пол епителне ћелије повећавају њену функционално површину неколико десетина пута. Недавни напредак у технологији омогућио је да микрокамере буду убачене директно у шупљину мождане коморе. Ово је дало потпуно нови поглед на ХП, који импонује живој, растегнутој, пулсирајућој мрежи која плута у ЦСТ комора. *In vivo*, ХП практично испуњава највећи део волумена мождане коморе и није ни налик спласнутој структури каквом се презентује на аутопсији (Lehtinen и сар, 2013; Spector и сар, 2015).

Студија функције ХП биле су базиране на широком спектру методолошких приступа, и преважно су се бавиле истраживањем доминантне улоге ХП у секрецији ЦСТ. Информације о физиологији и патофизиологији ХП највећим делом су обезбеђиване коришћењем експерименталних, анималних модела. Последњих деценија са развојем софистицираних лабораторијских модела у виду генетски модификованих

мишева, расветљена је класична улога ХП у секрецији ЦСТ, али су откривене и многобројне друге функције у одржавању хомеостазе ЦНС-а и неуроимуном систему човека. Данас је познато да ХП има бројне и разноврсне функције још од свог настанка у раној ембриогенези, као и да се те улоге мењају и сазревају, заједно са променама структуре и функције целокупног ЦНС-а. ХП је важан интегрални део крвно-ликворне баријере, секретује, пречишћава и одржава састав ЦСТ, ствара интракранијални притисак, одржава хомеостазу интракранијалне средине регулишући концентрацију јона у ЦСТ, уклања разградне материје и продукте непотребне ЦНС-у и ствара и секретује читав низ биокативних молекула, трофичких и регулаторних сигнала, често са бројним и удањеним улогама. Класична улога ХП је у продукцији ЦСТ, чиме се мозгу обезбеђује течни, нутритивни миље и формира механичка заштита. Током последње деценије, међутим, откривено је да ХП учествује у различитим аспектима мождане хомеостазе, те је хороидном плексусу приписан далеко већ број улога (Emerich и сар, 2005; Engelhardt и Sorokin, 2009; Johanson и сар, 2011). Због своје структуре и позиције у мозгу, ХП је константно експониран сигнаlima који долазе из циркулације са једне стране, а са друге, сигнаlima из можданог паренхима, који сви могу утицати на функцију ХП (Baruch и Schwartz, 2013). Најновија истраживања посматрају ХП у својству изузетно значајног учесника у развоју ЦНС-а и неуроногенези. Недавно је препознато да ХП регулише секрецију сигналних молекула и фактора раста који обликују развој и сазревање неуроаксиса. ХП учествује у регулацији микрооколине неуралних матичних ћелија и свих етапа развоја и сазревања ЦНС-а, доприносећи успостављању неуралне функције и одржавању пластичности мозга практично током целог живота (Damkier и сар, 2013; Johansson, 2014).

Модерне радиолошке методе снимања учиниле су доступном визуелизацију интракранијалних структура. Различите имиџинг методе омогућавају лак, неинвазиван приступ сазнањима о стању структура ЦНС-а у нормалним условима, као и у различитим патолошким стањима. Тако су у пределу ХП, веома често су случајно уочаване сенке калцијумове густине, које су означаване као калцификати. Описани калцификати су се у бочној комори најчешће локализовали у пределу гломуса, који се налази на граници између њеног централног дела и потиљачног рога, док је њихова појава била најконзистентнија са радиолошком пројекцијом ХП четврте мождане коморе, где је и број калцификата био највећи. Њихово присуство је изузетно ретко уочавано у ХП треће коморе. Псамоматозна телашца никада нису забележена у феталним ХП и у ХП



неонатуса, међутим, од детињства када се могу радиолошки регистровати, њихова инциденца, као и број константно расте са годинама живота. Тако је инциденца налаза ПТ 0,5% у првој деценији живота, а у осмој расте на 86% (Modic и сар, 1980; Korzhevskii, 1997).

Псамоматозна телашца су концентричне, ламелиране, калцификоване структуре које се класично сматрају последицом дистрофијске калцификације, где се депозиција калцијума одвија у невијабилним или некробиотичним, умирућим ткивима, у условима нормалног нивоа серумског калцијума и у одсуству поремећаја метаболизма калцијума. То су формације сачињене из колагених вртлога, округлог облика и стакластог изгледа, величине 50-150µм, али некада и преко 300µм. Псамоматозна телашца нормално су присутна у строми хороидног плексуса човека у свим узрастима (Modic и сар, 1980; Kumar и сар, 2008; Jovanović и сар, 2004, 2007, 2014). Етиопатогенетски механизми настанка ПТ у ХП још звек нису у потпуности расветљени. Поред тога, познато је да се ПТ могу видети у различитим патолошким ненеопластичним и неопластичним стањима. Заједничко обележје хуманог хороидног плексуса, који нормално може садржати ПТ, и бенигну и малигну неопластичних процеса где се ПТ најчешће могу видети јесте папиларна морфологија. Псамоматозна телашца се најчешће могу видети код папиларног карцинома штитасте жлезде, менингеома и папиларног серозног аденокарцинома јајника, а веома ретко могу бити присутне и у другим неоплазмама и ненеопластичним лезијама. Етиопатогенеза, инциденца, удруженост са патохистолошким карактеристикама и значај појаве ПТ била је тема великог броја студија које су истраживале патолошка стања удружена са појавом ектопичне калцификације и ПТ. Међутим, многа од ових истраживања представљају приказе случајева, одакле је тешко екстраполирати резултате на целу групу истраживаног ентитета. Поред свега, структурне разлике између ПТ хороидног плексуса и ПТ насталих у патолошким стањима за сада нису описане.

Упркос великом броју студија спроведених у последње четири деценије, механизам стварања ПТ остао је слабо расветљен. Ултраструктурне студије папиларног карцинома штитасте жлезде показале су да задебљање базалне ламине у васкуларној петелци неопластичне папиле праћено тромбозом, калцификацијом и некрозом туморских ћелија доводи до стварања ПТ. У бројним студијама интерпретација налаза везаних за ПТ везује се за појам дистрофијске калцификације. Према LiVolsi-ју, права

ПТ у папиларном карциному штитасте жлезде формирају се путем инфаркције фокалних области на врховима папила, вероватно услед тромбозе ситних, деликатних крвних судова или оштећења проузрокованих минималном траумом (LiVolsi, 2004). Ова права ПТ разликују се од дистрофијске калцификације, која показује тенденцију да буде ирегуларног облика, назупчених ивица и контура и веома ретко показује ламелираност и луковичасту структуру. С обзиром на то да се ПТ и ирегуларне калцификације могу наћи истовремено у неким случајевима папиларног тироидног карцинома, намеће се питање да ли ова два ентитета представљају два различита патогенетска механизма или се могу објаснити јединственим процесом. Студије на серозном цистаденокарциному јајника и менингеому, међутим, разоткривају да су за стварање ПТ одговорни продукција колагена од стране неопластичних ћелија и следствена калцификација. Постојање одређених прекурсорских форми ПТ описано је код менигеома и недавно у папиларном карциному тиреоиде. Ове ране, насцентне форме будућих ПТ представљене су екстрацелуларним хијалиним глобулама, које окружују добро очуване неопластичне ћелије или их, у мањем броју случајева, чине интрацитоплазматска хијалина телашца ослобођена из интактних туморских ћелија. Ћелијска дегенерација и некроза која доводи до нестанка неопластичних ћелија забележена је само око формираних ПТ, али не и у околини прекурсорских форми. У складу са овим, постављена је хипотеза да ПТ, пре него што би представљала последицу дистрофијске калцификације мртвог или умирућег ткива, могла би заправо репрезентовати активан билошки процес који коначно доводи до дегенерације или смрти туморских ћелија и успоравања раста неоплазме. Такође, ПТ могла би представљати својеврсну баријеру против ширења неоплазме (Das, 2009).

У процесу дистрофијске калцификације, појединачна некротична ћелија чини језгро, зачетак кристала, и бива прожета минералним депозитима, док прогресивно додавање спољашњих слојева ствара ламелирану конфигурацију, те тако настаје ПТ. Дистрофијска калцификација одвија се кроз две главне фазе: иницијација (нуклеација) и пропација, које се могу одигравати интра- или екстрацелуларно. Док се иницијација интрацелуларних калцификација дешава у митохондријама мртвих или умирућих ћелија, иницијатори екстрацелуларне калцификације су фосфолипиди садржани у мембранама везикула, коју су величине око 200нм (Kumar и сар, 2008). Анализирајући компоненте ПТ у менигеомима, Creda-Nicolas је сматрао да су иницијатори формирања ових калцификујућих телашца капилари и дегенеративно измењене ћелије (Creda-

Nicolas, 1992). Tubuchi и сарадници имунохистохемијски су доказали присуство IgG у крвним судовима, вртлозима и псамоматозним телашцима у менингеомима (Tubuchi и сар, 1981). Они су сугерисали могућност да хуморални имуни одговор има улогу у формирању вртлога и ПТ, али се само мали број даљих студија подробније бавио анализом њихових тврдњи. Јовановић и сар. анализирали су имунореактивност на имуноглобулинске лаке ланце у псамоматозним телашцима хороидног плексуса (Јовановић и сар, 2014). Они су утврдили да су ПТ доминантно позитивна на ламбда лаке ланце имуноглобулина, те да су ламбда-позитивна ПТ заступљена у значајно већем проценту у односу на ламбда-негативна ПТ у 80% испитиваних узорака хуманог хороидног плексуса. Поред тога, утврђено је да се проценат ламбда-позитивних ПТ повећава са годинама живота.

Ово истраживање бавило се проценом морфологије и броја псамоматозних телашаца у ХП све четири мождане коморе током процеса старења. Морфометријска анализа обухватила је ПТ, епител и крвне судове строге папила ХП у циљу квантификације површинске густине ХП и волуменске густине крвних судова. Поред одређивања броја ПТ у сваком од испитиваних узорака ХП, вршена су мерења следећих параметара: просечна тотална ареа, просечни периметар, Феретов дијаметар, као и нумеричка и волуменска густина ПТ. Ово истраживање представља покушај да се испита предиктивни значај старости, пола, морфологије и броја ХП на промене у морфологији и структури ХП све четири мождане коморе. У том циљу, анализирани су репрезентативни хистолошки пресеци ХП, са хороидним вилусима сачињеним од фиброваскуларне сржи од везивно-ткивне строге са крвним судовима и покровног једноредног епитела ХП. На попречним, косим и уздужним лонгитудиналним пресецима вилуса ХП регистроване су бројне аморфне калцификације. ПТ су била присутна у виду две форме, као незрела ПТ са аморфним језгром и зрела ПТ, ламелиране морфологије. Присуство ПТ није било забележено у пет случајева, четири узорка из четврте мождане коморе и једном узорку из ХП треће мождане коморе, те су они искључени из морфометријске анализе.

Студије квантитативне анализе ПТ, епителних и стромалних компоненти ХП су веома малобројне. Највећи број студија које у фокусу имају псамоматозна телашца, испитују њихову појаву у патолошким, углавном неопластичним стањима. Велики допринос сазнању о морфолошким, хистохемијским и имунохистохемијским

карактеристикама ПТ у патолошки неизмењеном ХП, код особа које нису за живота боловале од неуродегеративних или неуролошких обољења, као и њиховој корелацији са старашћу и забележеним морфометријским променама у функцији година живота, дала је група аутора окупљена око Јовановића (Jovanovic и сар, 2004, 2007, 2009, 2010, 2014).

Са старењем у ХП развијају се бројне структурне и функционалне промене, које и саме даље могу доприносити интензивнијем развоју морфофункционалних старосних промена (Serot и сар, 2001, 2003). Данас је прихваћен став да су промене ХП удружене са старењем у основи пропадања когнитивних функција и развоја неуродегенеративних промена у ЦНС-у код особа старије животне доби. Многобројне студије Алцхајмерове болести указују на практично једнак анатомски супстрат онога што се сматра физиолошким старењем и ове тешке неуродегенеративне болести, али са драматичном разликом у интензитету, тј. степену и брзини наступања ових промена (Emerich, 2004; Duyskaerts и сар, 2010). Са старењем смањује се ниво експресије рецептора као што су протеин-1 и протеин-2 придружени рецептору за липопротеин мале густине (LRP-1 и мегалин), помоћу којих се амилоид- $\beta$ , пептид који се константно ствара, уклања из ЦСТ путем ХП. Измењена експресија и једног и другог рецептора може довести до акумулације амилоида- $\beta$  у ЦСТ и настанка патолошких промена које се виде у Алцхајмеровој болести. Сматра се да акумулација ових протеина оставља тешке последице по функцију неурона, а густина ових акумулација корелира са тежином симптома (Pascale и сар, 2011).

Структуралне карактеристике ХП чине га вулнерабилним на дејство две групе фактора: оних који преко његових крвних судова могу да доспеју из системске циркулације и, оних коју преко његовог епитела могу да доспеју из можданог ткива преко цереброспиналног ликвора. Процес старења је праћен повећаном изложеношћу свих структура људског организма, укључујући и ХП, штетним агенсима (Levine, 1987). Већина аутора описује да се присуство ПТ током процеса старења повећава, у нумеричком смислу и у смислу повећања величине самих ХП. Са временом, долази до сазревања све већег броја незрелих ПТ аморфног језгра, док се повећава број ирегуларних калцификованих прстенова у луковичастим ламелама (Dohrmann, 1970; MacPherson и Matheson, 1979; Modic и сар, 1980; Rubenstein, 1998; Serot и сар, 2001). Недавно је утврђено да пораст величине и нумеричке густине ПТ током процеса старења

није линеаран (Jovanović и сар, 2007). Наиме, током кластер анализе установљен је пораст ПТ током старења, али вредности просечне укупне арее по случају су биле сигнификантно више у II групи, чија је просечна старост 59. година, у односу на I, са просечном старашћу од 41, и на III групу, са случајевима просечно старим 68 година. Вредности III групе су сигнификантно више у односу на I групу, што указује на тренд пораста присуства ПТ у ХП током процеса старења, али он није линеаран. Могуће објашњење ове појаве је да долази до интензивирања процеса који иначе доводи до стварања ПТ током процеса старења, а друго је да је у другој групи био присутан још неки други узрок, који је поспешео стварање ПТ.

Резултати овог истраживања показали су да се запреминска густина ПТ повећава са годинама и она је статистички значајно већа у десној бочној можданој комори у старосној групи испитаника животне доби преко 70 година. У складу са морфометријским налазима ПТ, забележено је смањење површинске густине ХП у десној бочној можданој комори, што се бар делимично може објаснити деструкцијом вилуса ХП услед стварања великог броја ПТ. До данас су старосне промене у ХП описане у скромном броју студија. Ове студије углавном су биле базиране на експерименталним животињама (мишевима и пацовима) или су, пак обухватале контролне случајеве приликом испитивања оболелих од Алцхајмерове болести. У овим истраживањима старосне промене ХП представљале су узгредан налаз коме није поклањано много пажње, изузев у контексту компарације интензитета промена у односу на Алцхајмерову болест (Sturrock, 1988; Serot и сар, 2000, 2001, 2003). С друге стране, између ХП експерименталних животиња и човека постоје извесне структуралне разлике, те се резултати не могу једнозначно превести са анималног нивоа на хумани. У већини ових истраживања, присуство ПТ није анализирано, нити је присуство ПТ узимано у обзир као варијабла која би могла да корелира са испитиваним параметрима. Код истраживања на анималним моделима, ПТ до сада нису детектована у строми пацова и мишева (Serot и сар, 2001), док у студији која је била фокусирана на промене ХП удружене са Алцхајмеровом болешћу, у анализираном хуманом ткиву ХП новорођенчади и здравих одраслих особа нису наведени подаци о присуству, бројности и дистрибуцији ПТ (Serot и сар, 2000).

У трећој можданој комори забележен је пад густине крвних судова, што може бити последица задебљања зидова крвних судова које условљава смањење њиховог

калибра и може значајно редуковати перфузију вилуса. Старосне промене описане су и на крвним судовима строге ХП описане су у студијама на пацовима На фенестрираним капиларима било је могуће распознати регуларно, равномерно задебљање базалне мембране ендотела. Ово задебљање зидова капилара, иако може повећати дебљину базалне мембране и двоструко, увек је мање изражено него задебљање епителне мембране. У артериолама, које се налазе у базалним, коренским деловима хороидних папила, може се видети задебљање медије, са пратећом фиброзом и фрагментацијом еластичних влакана и задебљање адвентиције (Serot и сар, 2001; Emerich и сар, 2005). У принципу, стромалне промене ХП су знатно слабије проучаване током претходних истраживања. Већина истраживача је фокусирао своју пажњу на хороидни епител, који је означен као структура одговорна за извршавање највећег броја функција ХП. Са старењем, у строми долази до повећаног депоновања колагених влакана и нефибриларних компоненти екстрацелуларног матрикса, са присуством хијалиних депозита, ПТ, калцификата и задебљања зидова стромалних крвних судова. Такође је у истраживањима описана и учесталија појава цистичних формација, које су уочене током морфолошке анализе нарочито код случајева где се у вилусима ХП региструје присуство великог броја ПТ (Serot и сар, 2001; Jovanovic и сар, 2009 и 2010).

Са старењем долази до генерализованог смањења густине капиларне мреже, а овај процес је посебно изражен у мозгу, нарочито после 50. године живота. Код особа са знаковима деменције, постоји израженије увртање и спирализација малих крвних судова, што је последица задебљавања базалне мембране капилара. То их чини осетљивијим на ендотелну или луминалну компресију, а крвно-моздана баријера постаје пропустљивија. Бројне студије указале су на хроничну хипоскију као основни узрок дисфункција неурона која се јавља са старењем, а она настаје често као последица отежаног транспорта кисеоника кроз мембране, упрето због структурних измена на малим крвним судовима мозга (Troller и сар, 2001; Hunter и сар, 2012). Морфометријска анализа броја капилара у сивој и белој маси мозга код неуролошки здравих старијих особа није показала статистички значајне разлике у односу на број капилара код пацијената са Алцхајмеровом болешћу, што значи да је процес физиолошког старења сам по себи инхерентан са пропадањем микроваскулатуре, чак и ван контекста неуродегенеративне болести. Са старењем се повећава број крвних судова који имају изглед струне. Наиме, хипоерфузија узрокује у крвним судовима малог калибра потпуни прекид протока, што узрокује апоптотску смрт ендотелних ћелија и колапс

капилара. То резултује стварањем крвних судова у виду струне, који заправо немају прави лумен. Међутим, сличност у микроваскуларној густини не мора нужно да одсликава и функционалну једнакост. Са старењем долази не само до морфолошких промена, већ и до губитка инервације, што подржава хипотезу да и саме хемодинамске промене узрокују са старошћу удружене функционалне промене у ЦНС-у и когнитивно пропадање. Поред свега наведеног, пропадање малих крвних судова у вилусима ХП може да промовише молекуларне каскаде које резултују секрецијом проангиогених фактора и инфламацијом (Brown и Thore, 2011; Hunter и сар, 2012).

Морфолошке промене ХП удружене са старењем обухватају епителну атрофију, стромалну фиброзу и повећање тежине ХП. Са старењем епител хороидног плексуса човека се заравњава, са могућом појавом потпуно аплатираног, љуспастог епитела у деловима папила где је у строми дошло до формирања цистичних формација, најчешће удружених са присуством бројних ПТ. Задебљавају базална мембране епитела, нешто израженије, као и базална мембрана стромалних крвних судова, али у нешто мањој мери. Притом, повећава се дебљина везивног ткива које лежи испод базалне мембране. Старосне промене евидентне су и у строми, која задебљава, а у њој се повећава садржај колагена влакна са развојем ирегуларне фиброзе строме (Rubenstein, 1998; Serot и сар, 2003; Emerich и сар, 2004; Jovanovic и сар, 2007, 2009).

Присуство великих ПТ било је значајно повезано са упадљивим променама епитела ХП: заравњењем и атрофијом епителних ћелија, присуством интрацитоплазматских цистичних формација и крупнијих вакуола, које често деформишу ћелију и доводе до дислокације нуклеуса (Jovanovic и сар, 2009 и 2010). Методом астереологије у овом истраживању анализирани су епителне ћелије хороидног плексуса. Притом су за саме ћелије, као и за једра епителних ћелија, одређиване ареа, периметар, Феретов дијаметар, обликовани фактор, висина епитела, као и нуклео-цитоплазматски однос. Резултати су показали да са старошћу, долази до пораста периметра и Феретовог дијаметра епителних ћелија, након 50. године живота. Поред тога, забележен је и статистички значајан пораст нуклеоцитоплазматског односа, без обзира на упоредан пораст и Феретовог дијаметра једра епиталних ћелија. Анализирани параметри, пре свега виши обликовни фактор, указују и на то да са старошћу облик једра постаје све ирегуларнији. Ови резултати су у складу са претходно објављеним резултатима других аутора и иду у прилог значајним структурним променама које

наступају у епителу ХП код особа старије животне доби. Наиме, раније је нађено да се са старењем епител хороидног плексуса се заравњава да се дешавају промене у облику епителних ћелија. Епителне ћелије добијају нискокубоидални фенотип, а њихова апикална, вентрикуларна површина може да се деформише у куполасту форму. Једра постају ирегуларна и елонгирана, док се у цитоплазми може регистровати све већи број липидних вакуола, фибрилларне инклузије означене као Бионди телашца и депозита липофусцинског пигмента. Електрономикроскопски, на апикалној површини епитела упадљива је редукација броја микровила, који постају хаотично распоређени, а на неким од епителних ћелија развијају се велике, апикалне цитоплазматске протрузије у виду палица.

У овом истраживању није установљена статистички значајна разлика у висини епителних ћелија између испитиваних група, иако је утврђено да она показује тенденцију смањења између испитиваних група, са  $8,37 \pm 0,79 \mu\text{m}$  у првој испитиваној групи,  $8,35 \pm 0,87 \mu\text{m}$  у другој и  $7,92 \pm 1,05 \mu\text{m}$  у трећој групи узорака ХП. Раније је саопштено да код новорођене деце висина епителних ћелија ХП износи  $15 \mu\text{m}$ , док код особа у сенијуму она износи  $13,7 \mu\text{m}$ , са трендом смањења 11% почев од рођења до 88. године живота (Serot i sar, 2000; Preston, 2001). Морфолошке студије старосних промена ХП код пацова су показале су такође значајан степен атрофије епителних ћелија током старења. Висина ћелија епитела са  $12,5 \mu\text{m}$  у шестом месецу редукује на  $11,5$  и  $10,5 \mu\text{m}$  у осамнаестом, односно тридесетом месецу (Serot и сар, 2001). Вредности дебљине епитела које су добијене током морфометријске анализе ниже су неких раније наведених. Пре свега, ниже вредности висине епитела могле би се бар делимично објаснити начином обраде и пропреме хистолошких пресека ХП за анализу. Приликом овог процеса користи се фиксација ткива у 10% неутралном формалину, која може да узрокује значајне волуметријске промене и изазове скврчавање ткива скоро 20%. (Kinoshita и сар, 2001). Међутим, овде добијене вредности веома су сличне онима које су навели Јовановић и сарадници (Jovanovic и сар, 2009). Они су кластер анализом установили значајну повезаност између присуства псамоматозних телашца и атрофичних промена у епителу ХП. У групи где је број ПТ био највећи, смањена дебљина епитела, израженији степен епителне атрофије и израженије формирање цисти забележено је и код испитаника млађе животне доби. Ово би могло указивати на то да не само старење, већ и формирање великог броја ПТ, чија етиопатогенеза може бити удружена и са другим, од узраста независним факторима, може допринети епителној атрофији ХП. Поред



наведеног, наши резултати показали су извесне разлике између анализираних морфометријских параметара епителних ћелија и њихових једара између узорака ХП десне и леве мождане коморе. Уочено је да само у ХП добијеном из левих бочних комора мозга постоје разлике између различитих старосних група. Наиме, у епителу ХП леве коморе са старењем долази до постепеног пораста периметра и Феретовог дијаметра епителних ћелија. Феретов дијаметар епителних ћелија показује пораст са старошћу и у епителу четврте мождане коморе, док за епител треће коморе нису утврђене значајне разлике у испитиваним параметрима. Ове разлике могу бити условљене дискретним разликама у биолошким карактеристикама између ХП комора, пре свега разликама у васкуларизацији. Наиме, с обзиром да са старењем неизбежно долази до настанка промена на ситним крвним судовима мозга, у смислу артериолохијинотичног задебљања зида чак и код нормотензивних, нормогликемичних и нормолипемичних особа, па тако и крвним судовима ХП, асиметрија у овим васкуларним променама могла би да објасни разлике између десне и леве бочне мождане коморе.

Морфометријска анализа псамоматозних телашаца показала је разлике у односу на старост узорака само у ХП десне латералне и треће комори мозга. Након 70. године старости, односно у трећој анализираној старосној групи, уочен је пораст запреминске густине ПТ у хороидном плексусу десне латералне коморе. У нивоу ХП треће мождане коморе мања нумеричка густина забележена је у првој старосној групи. Насупрот томе, у другој и трећој старосној групи облик ПТ је био ирегуларнији у хороидном плексусу десне бочне коморе. Ови резултати који указују на повећање запреминске густине и ирегуларности ПТ у ХП у складу су са већ објављеним резултатима (Јовановић и сар, 2004). Међутим, за разлику од претходних истраживања, просечна ареа и просечни дијаметар појединачних ПТ нису показале значајну повезаност са старењем, нити је између старосних група забележена разлика у овим параметрима. Још је поред тога забележено прогресивно смањење периметра ПТ током старења код ПТ треће мождане коморе. Ово би могло бити у директној узрочно-последичној вези са падом густине крвних судова који је регистрован у трећој комори у овом истраживању. Овакав налаз сугерише да фактори који у строму хороидног плексуса улазе путем фенестриране капиларне мреже могу деловати протективно на ХП.

Запажене разлике у величини и нумеричкој густини ПТ између леве и десне бочне коморе могле би бити последица разлика у васкуларизацији, ако се узме у обзир

чињеница да фактори из циркулације могу доприносити формирању ПТ. Наиме, сама физиологија хороидног плексуса заправо је извор највеће загонетке у склоности нормалног и неопластичног ткива пореклом из хоридног плексуса да калцификује. У складу са својим бројним и веома активним транспортним функцијама, хороидни плексус филтрира и секретује многобројне протеине цереброспиналне течности и долази у контакт са хиљадама циркулишућих протеина. На пример, приликом анализе узорак добијених постмортем немогуће је разлучити да ли хоридни плексус заиста ствара остеопонтин или коштане морфогенетске протеине, који би могли стимулисати стварање калцификата у ХП, или заправо само апсорбује ове факторе из крвотока. Са друге стране, могуће је да се фактори који стимулишу биоминерализацију нормално филтрирају и секретују у хороидном плексусу, али да старосне или неопластичне промене, које се манифестују у измењеној генској експресији фактора који су укључени у транспорт, смање или онемогуће адекватну секрецију. У таквим околностима, нагомилавање ових фактора би онда могло довести до покретања сигналних каскада које резултују калцификацијом, а у неким ретким случајевима и осификацијом (Manjila и сар, 2014).

Волуменска густина и периметар ПТ показују снажну корелацију са смањењем површинске густине ХП. Крупнија и густо пакована ПТ добар су предиктор оштећења ХП. Са друге стране, смањење густине крвних судова импонује као директна последица процеса старења. Структурне промене ХП повезане са старењем, пре свега задебљане базалне мембране и згушњавање околне строме у фиброваскуларној петелци вилуса ХП, у комбинацији са ПТ великог Феретовог дијаметра могу узроковати смањење снабдевања крвљу ХП.

У хистохемијској анализи попречних, косих и лонгитудиналних пресека вилуса ХП, у овом истраживању регистрован је велики број аморфних калцификација. Овакав тип формација у вилусима ХП регистрован је у свим испитиваним старосним групама, али је њихов број био већи у строми папила ХП где је број формираних ПТ био мањи. За аморфне калцификације може се претпоставити да представљају почетне фазе у формирању ПТ. Наиме, у појединим вилусима уочено је задебљање појаса строме који се налази између базалне мембране епитела и ендотела крвног суда у вилусу. Ово задебљање настаје вероватно као последица повећане депозиције везивно-ткивних влакана које проиводе стромални фибробласти, али се при том не запажа и увећање броја

ћелија. Целуларност у околини ових кондензованих, неправилних формација није повећана ни на рачун других не-мезенхимних ћелијских типова. Нема повећања броја округлих до овалних, изразито тамних, хетерохроматичних једара лимфоцита, који су веома ретки, нити морфолошки препознатљивих овоидних једара мутног хроматина макрофага који воде порекло од моноцита периферне крви. Пролиферација везивног ткива формира механички притисак на зидове околних крвних судова, те може изазвати спољашњу компресију, сужење лумена и делимичну дислокације крвног суда из средишта ка бази вилуса XII. Ова фаза која се одликује само убрзаном акумулацијом колагених фибрила без пратеће минерализације представља почетну фазу у формирању ПТ.

У следећој етапи, долази до стварања незрелих ПТ. На местима аморфних телашаца у строми папила, а у нивоу централних делова пролиферисаног везивног ткива, уочавају се зоне неправилног облика, у којима долази до нагомилавања аморфног материјала који се на препаратима бојеним рутинском хематоксилин-еозин боји тамно плаво. То може да укаже на присуство калцијума у њима. Такве зоне се на препаратима бојеним Mallory трихромним бојењем пребојавају тамно црвено, што може да укаже на присуство фибрина, али и нуклеарног материјала. Интензивна црвена пребојеност на препаратима бојеним Mallory трихромним бојењем указује да се присуство фибрина у тим зонама не може искључити. Фибрин настаје полимеризацијом великог, фибриларног молекула крвне плазме, фибриногена, те присуство фибрина указује у обичним околностима на присуство запаљења, јер овако велики молекул може да прође само кроз значајно оштећен ендотел. Међутим, крвни судови папила XII су фенестрираног типа, где су поре између ендотелних ћелија покривене само танком дијафрагмом, те је излазак фибриногена могућ и ван контекста инфламације. У овој фази сматра се да се развија иницијална биоминерализација, тј. да долази до таложења калцијумових соли, које се везују за матриксне протеине. Облик вилуса може да буде значајно измењен и деформисан, са скраћењем папила, при чему се уочава повећање његове ширине. Ово има за последицу деформацију облика епителних ћелија, које могу импоновати аплатирано, заравњено, а може доћи и до спуштања латералних делова апикалне мембране и формирања куполастих ћелија, чији апикални, вентрални део се полулоптасто избочује у лумен коморе услед тракције бочних крајева. У каснијој фази долази до заравњења и спљоштавања епителних ћелија. Промене у облику и висини епителних ћелија праћене су деформацијом једра које постаје хиперхроматично и

тамније пребојено, са губитком регуларности контура. Поред тога, може се видети и вакуолизација епителних ћелија у вилусима ХП у чијој се строми овакве структурне формирају. На крају, долази до потпуног заравњења вилуса и формирања почетне форме псамоматозног телашца. Ове форме ПТ су на препаратима бојеним хематоксилин-еозин методом показивале слабији степен калцификације и биле су црвено пребојене, са нешто тамније пребојеном периферијом. Унутрашњи делови ових незрелих ПТ имају аморфну грађу, без изражених ламела. У њима нема уочљивог ћелијског садржаја, али је могућ налаз плавичастих депозита фрагментисаног нуклеарног материјала. На присуство нуклеарног материјала у овим формама делимично указује и и црвено пребојен средишњи део након примене Mallory технике. Међутим, присуство црвене боје може да укаже и на присуство фибрина у њима. Плава пребојеност периферије, након примене Mallory технике, указује на присуство колагених влакана. Оваква ПТ су локализована у непосредној близини, у основи вилуса. Према томе, незреле форме ПТ су испољавале исти тип реакције на примењене методе бојења као и формације присутне у вилусима ХП. То индиректно указује на њихово могуће заједничко порекло и на закључак да оне представљају исте структуре у различитим фазама развоја.

Присуство ПТ у цистичним формацијама у строми фиброваскуларне сржи вилуса ХП описано је још пре две деценије (Korzhevskii, 1997). Међутим, тада овај морфолошки термин није био детаљније прецизиран, односно студија не наводи даљи опис њихове локализације и изглед. Раније је сугерисано да ПТ вероватно поспешују формирање цистичних формација и то уништавањем вилуса ХП, након чега на њиховом месту остају цистичне формације (Jovanović и сар, 2007). Приликом спроведене микроморфолошке анализе на хистохемијским и хематоксилин-еозин обојеним препаратима, цистичне формације биле су јасно удружене са крупним, зрелим, јасно ламелираним ПТ. Не може се искључити да цистичне формације, или бар њихове размере и величина, не представљају последицу процеса аутолизе и накупљања интерстицијалне течности око јасно формираних калкосферита. Ове промене, односно стварање цистичних формација, у овом случају настајало би као последица заживотне деградације протеина и отпуштања везане воде. Веома често, цистичне формације присутне су на самој периферији вилуса ХП, уз сам епителни слој. ПТ која су локализована у цистичним формацијама, на крајњој периферији, непосредно уз сам епител, ситнија су и мањих дијаметара, са мањим бројем јасно дефинисаних концентричних калцијумских ламела. Крупнија ПТ уочавају у дубљим деловима ресичастих пројекција ХП, у околини већих крвних судова. Крупнија

ПТ имају израженију ламеларну грађу, са јасно дефинисаним луковичастим, љуспастим слојевима, донекле ирегуларних контура. Код њих се уочава средњи део, који има аморфну и слабо изражену ламеларну грађу, док се око њега уочава мањи или већи број периферних ламела. Она имају правилан округао или, ређе, овалан облик, што потврђују високе вредности њихове циркуларности у све три групе. На препаратима бојеним ХЕ техником, ова зрела ПТ су црвено или светлије до тамно плаво пребојена, што указује на неједнак степен њихове калцифицираности. Углавном су крупнија телашца, са изразитијом ламеларном грађом, обојена плаво, што указује да су она више калцифицирана у односу на мања телашца. Овалне форме настају, вероватно, спајањем мањих ПТ, при чему настају већа ПТ, која су неправилнијег облика. Сматра се да већи број ламела указује на њихову већу старост и на дуже време депозиције калцијумских соли у просторним и временским слојевима (Korzhevskii, 1997). Њихов дубљи положај у цистичним формацијама могао би указивати на то да она временом са периферије ових формација бивају дислоцирана млађим ПТ касније насталим у преосталим вилусима (Jovanović и сар, 2004, 2007). Бојењем Mallory хистохемијском техником и код ових форми се уочавају телашца са плаво пребојеном периферијом и слабије црвено пребојеним средиштем. Ламеле зрелих ПТ су претежно плаво пребојене, услед присуства колагена, док су неке ламеле у околини аморфног средишта, као и периферна ламела црвено пребојене услед могућег присуства фибрина и/или нуклеарног материјала. Спољашње црвено пребојене ламеле могу да показују дисконтинуитет, импонују испрекидано, поготово на нивоу периферних ламела великих ПБ. Велика сличност у хистохемијском бојењу свих описаних форми стромалних промена индиректно потврђује њихово заједничко порекло, док већа величина и изразитија ламеларна грађа указују на већу старост базалније позиционираних ПТ у односу на претходне две форме. Очуван континуум пребојавања и сугерисаног састава одговарајућих компоненти у структурама означеним као аморфне калцификације, незрела ПТ и зрела, ламелирана псамоматозна телашца, највероватније указује и на заједнички континуум њихове еволуције.

На основу хистохемијске и микроморфолошке анализе, намеће се закључак да са појавом великих, крупних, зрелих ПТ долази до масовног пропадања вилуса ХП, највероватније због тога што телашца, највећим делом, почињу да се формирају у њима, потискујући крвне судове, компримујући строму и, самим тим, мењајући архитектонику хороидног вилуса у целини. Оваква деструктивна својства калцификација у виду ПТ по

структуру папиларне грађе у којој се развија описана су у истраживању на ткиву папиларног карцинома штитасте жлезде (Das и сар, 2004). Промене које изазивају деформацију вилуса доводе до прогресивне атрофије епитела. У почетним фазама она се карактерише појавом куполастих ћелија, а касније прогресивном вакуолизацијом и заравњењем епителних ћелија. С обзиром на то да су епителне ћелије функционално најважнија компонента ХП (Реџић и Segal, 2004), позитивна корелација између морфометријских карактеристика ПТ и епитела ХП указује да ПТ нису инертне структуре и да њихово присуство значајно утиче на структуру и функцију ХП, нарочито епитела (Jovanović и сар, 2009, 2010). У статистички значајном моделу стандардне вишеструке линеарне регресије утицаја испитиваних морфолошких параметара на висину епитела ХП, утврђено је да старост, периметар и Феретов дијаметар ПТ објашњавају само мали проценат варијансе, укупно доприносећи до 10%. Само периметар ПТ има јединствен допринос и са највећом предиктивном снагом корелира са висином хороидних епителних ћелија. Ови резултати су сагласни претходно објављеним налазима Bersani-ја и колега (1999), који су спровели истраживање на ХП здравих особа и особа оболелих од шизофреније. Поред тога што наводе и постојање аморфних калцификата у вилусима ХП, који су уочени и током морфолошке анализе, они тврде и да присуство калцификата у ХП здравих и оболелих од шизофреније није повезано са старењем. Код оболелих од шизофреније, поменути аутори је утврдила постојање корелације између величине калцификата у левом ХП са поремећајима мишљења код оболелих од шизофреније, док је величина калцификата на десној страни корелирала са вентрикуларно-можданом коефицијентом фронталних рогова бочне коморе. Природа уочене релације још увек није разјашњена, мада Bersani и сар. (1999) истичу да се највероватније ради о поремећају функције серотонинергичког система. Основу за то тврђење су пронашли у чињеници да се влакна из једара средње линије можданог стабла, која садрже 5-хидрокситриптамин пројектују у ХП, затим да 5-хидрокситриптамин и прекурсори 5-хидрокситриптамина изазивају смањење продукције ЦСТ у ХП. Даље они наводе да ХП поседује велики број рецептора за овај биогени амин (5-НТ1С и 5-НТ2С). Дејством преко својих рецептора, серотонин доводи до повећања протока крви кроз ХП и утиче на пермеабилност и секреторну активност епитела ХП. Стимулација 5-НТ2С типа рецептора 5-хидрокситриптамином доводи до повећања садржаја  $Ca^{2+}$  у епителним ћелијама, његовим ослобађањем из интрацелуларних депоа или пристизањем из спољашње околине. Повећање садржаја калцијумових јона интерферира са метаболичком активношћу епителних ћелија и доводи до њиховог директног и

индиректног оштећења на субцелуларном нивоу, са реперкусијама на секрецију ЦСТ на првом месту. На основу резултата морфолошке, морфометријске и статистичке анализе, значајно веће присуство ПТ у узорцима ХП испитиване групе веће старости, као и постојање значајне корелације између епителне атрофије и морфометријских карактеристика ПТ, могли би да сугеришу значај ХП у својству важног извора трофичких фактора, али и извора сигнала пластичности за неуроне. ПТ могу у ХП настајати као знак и последица оштећења ХП, било локално насталим или циркулацијом или ЦСТ пристиглим штетним факторима и токсичним агенсима. Са друге стране, деструктивне последице настанка ПТ у вилусима ХП, пре свега рефлектоване у виду морфофункционалног оштећења конститутивно хиперактивног епитела ХП, могу даље подстицати пропадање ХП. С обзиром на многобројне и есенцијалне функције ХП по хомеостазу ЦНС-а, последице оваквог циркуларног, штетног механизма могу довести до атрофије мозга и оштећења когнитивних функција.

Резултати овог истраживања показали су да је пол фактор који независно доприноси предвиђању величине ХП. Нађено је да је површинска густина код ХП иситаника мушког пола мања него код оних женског пола. Утицај полних хормона на ХП и цереброспиналну течност добро је документован и подразумева полне разлике у сигнализацији везаној за циркадијални ритам, баријерну функцију ХП, метаболичку активност хороидног епитела и диференцијацију матичних ћелија. Полни хормони представљају агенсе са неуропротективним дејством, које је доказано код неколико неуродегенеративних болести. Анализа диференцијалне експресије гена у ХП пацова мушког и женског пола показала је да постоји преко 3000 гена који показују различиту експресију код мушке и женске популације експерименталних животиња. Анализа транскриптома ХП, свеукупне количине информационог рибонуклеинских киселина које се преписују са генома ћелије, показала је да полни хормони имају значајан утицај на неколико важних неуросензорних и неурохуморалних сигналних путева. Протеомска анализа показала је да је пет протеина нисходно регулисано у ЦСТ, а да седам показује диференцијалну експресију код животиња мушког пола након гонадектомије, док код животиња женског пола након уклањања јајника овакве промене нису забележене. Могуће је да неки од протеина чија је експресија хормонски зависна испољава протективно дејство у очувању строге ХП и смањује вероватноћу настанка ПТ (Quintela и сар, 2016).

На бази ултраструктурних истраживања ПТ у неопластичним и нетуморским променама штитасте жлезде, искристалисали су се ставови да ПТ вероватно представљају завршну фазу два билошка процеса: задебљања базалне ламине васкуларне петељке неопластичне папиле, праћене васкуларном тромбозом, калцификацијом и некрозом туморских ћелија и, са друге стране, некрозе и калцификације интралимфатичних туморских тромба у ткиву штитасте жлезде у непосредној околини тумора или у контралатералном режњу жлезде (Johannessen и сар, 1980). Развој калцификујућих фокуса чест је налаз у штитастој жлезди у различитим патолошким стањима. Ултразвучним прегледом штитасте жлезде детектују се калцификације које се могу класификовати на макро- и микрокалцификације. Микрокалцификације су високоспецифични знак малигних неопластичних процеса, с обзиром на то да се могу често детектовати у папиларном и медуларном карциному штитасте жлезде (Triggiani, 2008). Хистолошком анализом утврђено је да ПТ углавном представљају микрокалцификације. Псамоматозна телашца су посебно значајна и конзистентна карактеристика папиларног карцинома, где њихова појава има дијагностички значај (Руо и сар, 2013; Вај и сар 2009). Псамоматозна телашца присутна су код готово половине случајева папиларних карцинома тиреоиде и њихово присуство корелира са неповољним клиничко-патолошким параметрима, као што су мултифокалност тумора, екстратиреоидно ширење и присуство метастаза у лимфним нодусима. Занимљиво је да је присуство псамоматозних телашца нађено у околном, нормалном ткиву штитасте жлезде у око половине случајева папиларног карцинома удружених са псамоматозним телашцима. Присуство екстратуморских ПТ такође корелира са неповољним прогностичким параметрима као што су мултифокалност и нодалне метастазе, и то статистички значајније у односу на туморе који имају искључиво интратуморска ПТ (Руо, 2013).

Бај и сарадници (Baї, 2009) извршили су прецизну хистолошку анализу калцификација у папиларном карциному штитасте жлезде. Они су класификовали калцификације на псамоматозна телашца, стромалну калцификацију и осификацију, тј. формирање кости. Псамоматозним телашцима означаване су структуре у облику сферичних калцификованих фокуса са јасно дефинисаним концентричним ламинацијама. Она су обично била лоцирана унутар стромалних петељки туморских папила и јасно су се разликовала од интрафоликуларних депозита сасушеног колоида. Аутори су идентификовали присуство ПТ и унутар острва стромалне калцификације.



Формирање кости дефинисано је искључиво као истовремено присуство коштаног матрикса и препознатљивих остеоцита. Сви остали облици калцификације који нису испуњавали строге критеријуме за ПТ или формирање кости, сматрани су стромалном калцификацијом. Овде су чак убрајане и псамоматоидне калцификације, које се карактеришу сферичним обликом без ламинације или са ирегуларним обликом ламинација. Стромална калцификација била је најчесталији облик депозиције калцијума у папиларном карциному и забележена је у готово 50% узорака, док су псамоматозна телашца нађена у 25% случајева папиларног карцинома. Наведени стриктни услови класификације објашњавају разлику у учесталости псамоматорзних телашаца у карциному тиреоиде, јер су у односу на традиционалних 50% ПТ позитивних карцинома, Баи и колеге су у ту групу сврстали двоструко мање тумора. Присуство псамоматозних телашаца у неопластичном ткиву било је статистички значајно повезано са присуством метастаза карцинома у регионалним лимфним нодусима, унапредовалим патолошким стадијумом болести, као и са краћим временом преживљавања пацијената. Занимљиво је да је стромална калцификација и стварање коштаног ткива значајно корелирало са старошћу пацијената, док за псамоматозна телашца није утврђена таква корелација (Bai, 2009). Међутим, само је присуство ПТ у тумору имало прогностички значај и статистички сигнификантно утицало на краће време без симптома код пацијената хируршки лечених од папиларног карцинома. Овакав налаз поткрепљује статус псамоматозних телашаца као маркера малигности, док се стромална калцификација и формирање коштаног ткива учесталије везују за бенигне лезије.

Фокуси калцификације чест су налаз у папиларном карциному штитасте жлезде, али механизам њиховог настанка још увек није познат (Carcangiu, 1985, Руо, 2013). Ендо и сарадници истраживали су да ли малигне тиреоидне епителне ћелије експримирају остеокалцин и *Cbfa-1/Runx2*, главни транскрипциони фактор за остеобластну диференцијацију, а тиме и експресију остеокалцина (Endo, 2008). Они су открили да у узорцима хируршки ресекваног папиларног карцинома штитасте жлезде постоји снажна експресија *Cbfa-1/Runx2*. У ћелијским линијама папиларног карцинома овај транскрипциони фактор повећава експресију алкалне фосфатазе, колагена типа 1 и остеокалцина, док, са друге стране, супримира експресију рецептора за тиреотропни хормон. Ендо и сарадници демонстрирали су да малигне епителне ћелије папиларног карцинома, као и фоликуларне епителне ћелије показују имунохистохемијску

експресију остеокалцина. Они су закључили да тиреоцити деле карактеристике са остеобластима, те да експресија *Cbfa-1/Runx2* може имати улогу у процесу калцификације који се јавља у папиларном карциному штитасте жлезде (Endo, 2008).

Папиларне неоплазме удружене са ПТ карактеришу се, углавном, индолентним клиничким током и повољном прогнозом. Бар делом повољан клинички ток псамоматозног карцинома јајника и перитонеума може се приписати дегенерацији и некрози туморских ћелија која је праћена настанком ПТ, што може деловати као својеврсна баријера против њиховог даљег ширења (Kuhn и сар, 1990). У већини студија псамоматозног карцинома јајника сматра се да ПТ представљају резултат туморске регресије, повезујући појаву ПТ у карциному са дужим преживљавањем.

Недавно објављена студија бавила се компаративним испитивањем састава и концентрације неорганских елемената у ПТ папиларног карцинома штитасте жлезде и серозног цистаденокарцинома јајника (Olivera Merlin и сар, 2012). Плазма емисионом спектроскопијом утврђено је да ПТ серозног аденокарцинома јајника и папиларног карцинома тиреоиде садрже у својој структури најмање осам неорганских елемената: калцијум, баријум, стронцијум, фосфор, магнезијум, никал, натријум и цинк. У много мањим количинама у ПТ се константно садрже и алуминијум, кадмијум, кобалт, бакар, хром, гвожђе и калијум. Није утврђена статистички значајна разлика између концентрација катјона у узорцима ПТ карцинома јајника и штитасте жлезде. Концентрација калцијума, бакра и гвожђа била је десет пута виша у ПТ серозног аденокарцинома јајника него у околном туморском ткиву. Ова разлика у концентрацији катјона, пре свега калцијума, последица је повећаног садржаја калцијум везујућих протеина који су удружени са ПТ, пре свега коштаних морфогенетских протеина и остеопонтин (Ito и сар, 2005). У погледу патогенезе папиларног серозног цистаденокарцинома јајника, остеопонтин, протеин екстрацелуларног матрикса који је експримиран у бројним малигним туморима, увек је присутан када долази до формирања не-корпускуларних калцификованих депозита. Ови депозити се прогресивно трансформишу у ПТ (Maki, 2000). Помоћу имунохистохемије и *in-situ* хибридизације, Maki и сарадници идентификовали су гликопротеин остеопонтин као могући фактор који узрокује развој ПТ путем акумулације калцијум фосфата (Maki, 2000). Ови резултати говоре у прилог томе да је ламелирано таложење калцијумових соли у

луковичасту структуру ПТ можда сложенији процес него што се то раније сматрало и укључује активну секрецију калцијум везујућих протеина од стране околних ћелија.

Остеопонтин је гликозилисани фосфопротеин који је обилно присутан у екстрацелуларном матриксу костију, али је широко распрострањен и у другим тивима, како везивним, тако и епителним, а присутан је и у крвном серуму и свим телесним течностима. Он има бројне улоге у процесима као што су ћелијска адхезија и миграција, ангиогенеза, антиапоптоза, имунолошки одговор, запаљење и зарастање рана (Nomiyama и сар, 2007, Gursoy и сар, 2010). Он се везује за CD44, који је само један од његових бројних рецептора (Anborgh и сар, 2011). У физиолошкој минерализацији, остеопонтин се експримира у ћелијама које су задужене за ремоделирање костију (Mazzali и сар, 2002). У току нормалне минерализације кости, остеопонтин пореклом из остеокласта инхибира стварање хидроксиапатита (Hunter и сар, 1994, 1996). Иако је код миша са knockout мутацијом OPN гена очувана релативно нормална структура кости (Rittling и сар, 1998), постоје докази који упућују на то да је остеопонтин укључен у ресорпцију коштаног ткива. На пример OPN knockout мишеви, код којих нема синтезе остеопонтина, упечатљиво су заштићени од хормонски условљеног губитка коштаног ткива након хируршког уклањања јајника (Yoshitake и сар, 1999). Поред тога, ресорпција кости која се одвија под дејством паратиroidног хормона такође је остеопонтин зависна (Inaga и сар, 2001). Улога остеопонтина испитивана је у процесу формирања каменаца, пре свега код холецистолитијазе, тј. калкулозе жучне кесе и билијарних путева, и уролитијазе, стварања конкремената у бубрежној карлици и чашицама и уринарним путевима. Према ранијим ставовима, сматрало се да остеопонтин има заштитну улогу у калкулози, спречавајући иницијалну кристализацију калцијум оксалата у бубрезима (Worcester и сар, 1995). Остеопонтин директно инхибира везивање кристала калцијум оксалата за реналне епителне ћелије у култури. Међутим, новије студије на хуманом материјалу и експерименталним моделима указале су да остеопонтин може деловати као сржни протеин у нидацији калкулуса. Остеопонтин је детектован у централним деловима калкулуса, у епителу калкуозне жучне кесе, као и у макрофагима који инфилтришу слузокожу (Ichikawa и сар, 2009). Полиморфизам OPN гена rs1126616 повећава вероватноћу за развој уролитијазе. Код особа које су носиоци полиморфног алела ниво остеопонтина у крви и урину је значајно снижен у односу на контролну популацију (Li и сар, 2015). Бројне студије указале су на улогу остеопонтина у модулацији туморске прогресије и метастазирању. Испитивање функције остеопонтина

у биологији тумора открило је да овај протеин синтетишу и секретују саме туморске ћелије, а да се он затим везује за интегрине и CD44, те на тај начин модулише миграцију и инвазију туморских ћелија (Irby и сар, 2004). Прекомерна експресија остеопонтина нађена је у бројним туморима, укључујући карцином јетре, желуца, дебелог црева и ректума, плућа и бубрега (Higashiyama и сар, 2007, Wang и сар, 2011, Matusan-Пijas и сар, 2011). У колоректалном карциному остеопонтин је идентификован као водећи биомаркер туморске прогресије (Irby и сар, 2004). Prall и колеге испитивали су значај квантитативне процене мунохистохемијског бојења на остеопонтин у карциному дебелог црева (Prall и сар, 2012). Извршили су микродензитометријску анализу дигиталних слика имунохистохемијског бојења на остеопонтин користећи јавно доступан софтвер ImageJ. Они су закључили да квантитативна процена имунореактивности на биомаркер има благу предност у односу на квалитативну, тј. семиквантитативну оцену имунохистохемијске експресије која не захтева употребу софтвера нити ангажује додатно време патолога. Предности квантитативне анализе су што се средња оптичка густина, параметар коојим је процењиван интензитет бојења на остеопонтин, изражава као нумеричка вредност, тј, објективни параметар који има велику репродуцибилност, искључује субјективне варијације међу проценама појединих патолога, омогућава једноставнију класификацију и међусобно поређење тумора, а да би се добила ова вредност потребно је само 2-3 минута након што се направи дигитална микрофотографија. Аутори сугеришу да је овакав модел микродензитометријске методе могуће применити на било који потенцијални биомаркер који даје цитоплазматско бојење (Prall и сар, 2012).

У овом истраживању, дифузна имунохистохемијска активност забележена је у практично свим псамоматозним телашцима, што је у складу са налазима ранијих истраживања. Раније је присуство остеопонтина детектовано методом *in situ* хибридизације у калцификованим деловима псамоматозних телашаца у серозном папиларном цистаденокарциному јајника (Maki и сар, 2000). У испитиваним узорцима оваријалног карцинома, остеопонтин је био имунопозитиван у готово сваком ПТ, док присуство остеокалцина и остеонектина није запажено. Потпуна, стопроцентна позитивност ПТ на остеопонтин у нашем истраживању, и доминантно негативан налаз имунохистохемијске експресије остеокалцина, указује на велику сличност имунопрофила ПТ која настају у ХП и ПТ која су удружена са неопластичним растом епителних ткива. Протеин остеопонтин код карцинома јајника није детектован ни у

једном од околних типова ћелија, али је зато информациона рибонуклеинска киселина, остеопонтинска mRNA, детектована у CD68-позитивним макрофагима који инфилтришу строму тумора, што указује на то да се остеопонтин ствара у макрофагима, а затим готово тренутно секретује ван ћелије. Након ове брзе транслокације остеопонтин из хистиоцита у коме се синтетише у екстрацелуларни простор, остеопонтин се импрегнише у ПТ, што може указивати на узрочну повезаност секреције остеопонтин са депозицијом калцијум фосфата у форми псамоматозних телашаца (Maki и сар, 2000). Иако није позната тачна улога калцификације повезане са секрецијом остеопонтин од стране макрофага, депозиција калцијума у облику ПТ могла би да доприноси кориговању стања хиперкалцемије које постоји у околини канцерских ћелија. Регулација нивоа калцијума у микроколини серозног папиларног цистаденокарцинома јајника путем макрофагне секреције остеопонтин могла би представљати имуни одговор домаћина на туморске ћелије. Међутим, иако предмет бројних студија, прецизни механизам и значај ектопичне калцификације кош увек није у потпуности разјашњен. Ни у овом истраживању, као ни у анализи папиларног цистаденокарцинома јајника, имунопозитивност на остеопонтин није забележена у епителним ћелијама. Остеопонтинско бојење сматрали смо негативним и у ћелијама хороидног епитела, и у ћелијским елементима строме.

С друге стране, имунохистохемијска реакција на остеопонтин забележена је у ћелијама менингеома, али и неких других тумора мозга (Hirota и сар, 1995). Менингеоми су најчешћи бенигни интракранијални тумори, сачињени од менинготелијалних ћелија пореклом из арахноидалне мождане опне, који се могу понашати агресивно и давати рецидиве (Arikok и сар, 2014). Светска здравствена организација класификује менингеоме у три главне категорије: бенигни (WHO градус I), атипични (WHO градус II) и анапластични (WHO градус III) (Louis и сар, 2007). У псамоматозној варијанти менингеома, ПТ су показивала интензивну имунореактивност на остеопонтин, без обзира на експресију протеина у туморским ћелијама. Имунохистохемијска анализа експресије остеопонтин код 139 тумора мозга показала је да већи интензитет имунореактивности на остеопонтин корелира са порастом градуса за менингеоме и неке глиоме. Наиме, више од 90% менингеома WHO градуса I било је негативно на остеопонтин или је показвало слабо бојење, док је 100% менингеома WHO градуса II и III било позитивно (Tsai и сар, 2012). Експресија остеопонтинске mRNA детектована је у неопластичним ћелијама папиларног карцинома штитасте жлезде, док је

имунохистохемијска анализа потврдила остеопонтинску експресију у туморским ћелијама, али не и у околном, очуваном ткиву штитасте жлезде. У папиларном карциному тироиде нађено је да остеопонтин има способност да индукује прекомерну експресију једног од својих рецептора, CD44. Сматра се да у папиларном карциному тироиде покретање киназне онкогене каскаде доводи до прекомерне експресије остеопонтина, који се везује за CD44, стимулишући на тај начин његову прекомерну продукцију, што повећава инвазивност туморских ћелија (Guarino и сар, 2005). Експресија остеопонтинске mRNA детектована је и у ћелијама које су окруживале ПТ код папиларних карцинома. Утврђено је да су ове ћелије заправо макрофаги. У овом истраживању, у строми хороидних вилуса забележено је присуство CD68 позитивних ћелија, односно макрофага, који би могли бити одговорни за стварање остеопонтина, калцијум везујућег молекула који се уграђује у ПТ XII.

За разлику од остеопонтинске експресије, ПТ у испитиваним узорцима нису показивала позитивност за остеокалцин. Остеокалцин је после колагена најобимније присутна компонента екстрацелуларног матрикса кости (Li и сар, 2016). Ген за остеокалцин, BGLAP, лоциран је на хромозому 1, 1q25–q31, и кодира синтезу пре-про-протеина од 98 аминокиселина (Puchacz и сар, 1989). Сазревање пептида се одвија у ендоплазматском ретикулуму, где се исеца сигнална секвенца која омогућава транспорт иницијалног продукта у цитоплазму, а затим и  $\gamma$ -карбоксилу три остатка глутаминске киселине на позицијама 17, 21 и 24. Ензим који врши карбоксилацију,  $\gamma$ -глутамил карбоксилаза, користи витамин К за своју функцију. Зрели, карбоксилисани остеокалцин пакује се у интрацелуларне везикуле како би био секретован у матрикс кости, где се остеокалцин везује за јоне калцијума у молекулу хидроксиапатита (Hauschka и сар, 1989, Willems и сар, 2014; Zoch и сар, 2016). Иако се mRNA остеокалцина може детектовати у екстраскелетним ткивима, изгледа да се транскрипт ван коштаног ткива непотпуно исеца и задржава неку од интронских секвенци, те изостаје транслација mRNA у протеин у цитоплазми. Транскрипти остеокалцинског гена нађени су у бројним органима, укључујући јетру, панкреас, слезину, тимус, простату и тестис. Остеокалцински транскрипти се котречно процесуирају у функционални протеин само у коштаног микрооколини (Jung и сар, 2001, Li и сар, 2016). Остеокалцинска mRNA у веома ниском нивоу експримира се и у тромбоцитим периферне крви и мегакариоцитима. Тромбоцити отпуштају остеокалцин у серум приликом тромбозе, али није јасно да ли је остеокалцин синтетисан у мегакариоцитима или је пореклом из остеобласта (Thiede и сар, 1994).

Поред структурне и регулаторне улоге у осификацији, остеокалцин је у виду хипокарбоксилисане, слободне форме присутан у циркулацији, путем које остварује своје хормонске ефекте (Zoch и сар, 2016; Li и сар, 2016). Велики делом своје хормонске функције остеокалцин остварује преко рецептора Grcβ, који се експримира на ћелијама масног и скелетно-мишићног ткива, као и на Лајдиговим ћелијама тестиса. Grcβ, рецептор упарен са Г протеином, поред остеокалцина могу активирати и разнородни лиганеди укључујући катјоне (калцијум и цинк), као и аминокиселине попут l-Arg и l-Lys (Clemmensen и сар, 2014). Зато се сматра да Grcβ има кључну улогу у регулацији протеинске нутриције. Остеобласти такође експримирају овај рецептор, а његова генетска аблација доводи до остеопеније (Pi и сар, 2008). Иако једини идентификован, Grcβ извесно није једини рецептор преко кога остеокалцин испољава своје дејство. Недостатак овог рецептора не резултује одговарајућим поремећајима понашања и неуротрансмитерске секреције који настају у условима недостатка остеокалцина, те се сматра да се ефекти остеокалцина у централном нервном систему остварују другачијим путем (Oury F, 2013).

Иако је обилно присутан у матриксу коштаног ткива, улога остеокалцина у коштаном ткиву још увек није у потпуности расветљена. Експерименталне *in vitro* студије показале су да остеокалцин спречава преципитацију калцијумових соли из засићених раствора, те се сматрало да је остеокалцин инхибитор минерализације костију (van de Loo, 1987; Zoch, 2016). Даља истраживања на анималним моделима утврдила су да код мишева којима недостаје ген за остеокалцин долази до повећаног стварања коштане масе у поређењу са контролом. Поред тога, кристали апатита били су већих димензија, што је указало на улогу остеокалцина у регулацији стопе минералног сазревања у костима (Boskey и сар, 1998). Међутим, студија на мишевима са прекомерном експресијом остеокалцина показала је да код ових животиња постоји релативно нормалан ниво минерализације костију (Murshed и сар, 2004). Стога, прецизна улога остеокалцина у коштаном матриксу остала је неразјашњена, а инхибиторни ефекат на минерализацију кости је веома ограничен. Остеокалцин би, пре свега, могао имати механичку улогу, јер чврсто везује хидроксиапатит и формира комплекс са колагеном помоћу још једног матричног протеина, остеопонтина. Остеокалцин се поставља и функционише као мост, обезбеђујући повезивање матрикса и минералних компоненти коштаног ткива (Ritter, 1992, Hoang, 2003). Овакав аранжман коштаног ткива компатибилан је са лоцирањем остеокалцина у тзв. дилатационим тракама,

нанометарским структурама важним за чврстину костију. У случају фрактуре кости, остеокалцин и остеопонтин спречавају ширење фрактурних пукотина истезањем и дисипацијом енергије (Nikel, 2013).

Недавно је нађено да остеокалцин има важну улогу у регулацији метаболизма глукозе. Након стварања у остеобластима коштаног ткива, остеокалцин може да уђе у циркулацију. Код експерименталних животиња којима је недостајао остеокалцин јављали су се драматични поремећаји метаболизма глукозе и изражена акумулација телесне масти, те се јавила претпоставка да, аналогно лептину и адипонектину, остеокалцин може функционисати као хормон. Утврђено је да остеокалцин повећава експресију адипонектина у масним ћелијама, док у  $\beta$ -ћелијама панкреаса повећава експресију инсулина и маркера пролиферације попут циклина Д1 (Lee и сар 2007; Hill и сар, 2014). У анималним моделима нађено је да парентерална или орална примена остеокалцина побољшава метаболизам глукозе, смањује ризик од настанка дијабетеса и редукује штетне ефекте дијете са високим садржајем масти на метаболизам (Mizokami и сар, 2013; Zhou и сар, 2013). Са друге стране, утврђено је да инсулин преко својих рецептора на остеобластима регулише стварање остеокалцина и повећава његову биорасположивост тако што стимулише карбоксилацију (Ferron и сар, 2010). Клиничке студије показале су да је ниво остеокалцина значајно снижен код гојазне деце и негативно повезан са осетљивошћу на инсулин. Значајан губитак телесне тежине, као и физичка активност, повећавају ниво циркулишућег остеокалцина и осетљивост на инсулин (Wang и сар, 2014, Kim и сар 2015). Полиморфизам гена за остеокалцин BGLAP у европској популацији повезан је са повећањем индекса телесне масе (Korostishevsky и сар, 2012). У целини, студије које су истраживале функције и дејство остеокалцина у хуманој популацији указују да су механизми откривени на анималним моделима далеко комплекснији код људи и укључују велики број фактора и медијатора (Zoch и сар, 2016). Значајне су и улоге остеокалцина у фертилитету и одржавању когнитивних функција. Полни хормони естроген и тестостерон имају велики утицај на раст и одржавање коштаног ткива скелета, али утицај у обрнутом смеру, тј. дејство коштаног ткива на гонаде, мало је истраживано. In vitro студије показале су да се под утицајем остеокалцина у тестисима повећава продукција тестостерона, али да нема ефекта на стварање полних хормона у јајницима. Касније утврђено да инсулин стимулише мушки фертилитет повећавајући метаболизам костију и остеокластима-посредовану активност остеокалцина (Ferron и сар, 2010, Oury F, 2013). У експерименталним студијама на



мишевима са апсолутним дефицитом остеокалцина забележене су бројне бихејвиоралне абнормалности, укључујући поремећај когнитивних способности и развој анксиозног и депресивног понашања (Oury F и сар, 2013). Једна недавна студија сугерисала је да се остеокалцин ствара у мозгу, те да може функционисати као неуропептид (Patterson-Buckendahl и сар, 2012). Међутим, рад Оурија и сарадника (Oury F и сар, 2013) показао је да циркулишући остеокалцин пролази хематоенцефалну баријеру и делује у можданом стаблу, међумозгу и хипокампусу, где утиче на синтезу неколико неуротрансмитера који фаворизују учење и стварање сећања (Oury F и сар, 2013). Ове студије демонстрирале су да остеокалцин промовише експресију гена укључених у синтезу моноаминских неуротрансмитера, а инхибира синтезу  $\gamma$ -аминобутерне киселине (GABA), са забележеним одговарајућим променама у нивоу серотонина, допамина, норадреналина и GABA-е. Занимљиво је да матернална продукција остеокалцина импонује неопходном за нормалан развој мозга фетуса и остеокалцин се може детектовати у феталној крви и пре него што започне његово стварање у телу фетуса.

Ендо и колеге истраживали су етиопатогенетску основу псамоматозних телашаца у папиларном карциному штитасте жлезде испитујући експресију остеокалцина и *Cbfa-1/Runx-2*, транскрипционог фактора коме се приписује кључна улога у остеобластној диференцијацији. *Cbfa-1/Runx-2* индукује сазревање остеопрогениторких ћелија у остеобласте, али може индуковати и трансформацију глаткомишићне васкуларне ћелије у правцу остеобласта. Појава његове експресије у примарно неостеогеним ћелијама може плурипотентне ћелије са својствима матичности које постоје у ткиву усмерити у правцу остеобластне диференцијације и стимулирати их на продукцију остеокалцина, колагена типа 1 и алкалне фосфатазе (Tyson и сар, 2003). Ендо и сарадници доказали су да сами тироцити експримирају *Cbfa-1/Runx-2*, док и неопластичне епителне ћелије папиларног карцинома тироидне жлезде показују чак веома јаки експресију. Остеокалцин је показивао интензивну позитивност у фокусима калцификације, али је снажна имунореактивност забележена и у туморским ћелијама папила ван калцификованих региона тумора (Endo, 2008). Иако је mRNA остеокалцина нађена у бројним ткивима, утврђено је да се функционални протеин ствара само у коштаном ткиву, јер транскрипти у неосеалним ткивима по правилу садрже и неке од интронских секвенци које чине протеин нефункционалним. Међутим, нађено је да ћелијска линија папиларног карцинома штитасте жлезде, BHP18–21, ствара транскрипт остеокалцинског

гена који не садржи интронске секвенце, тј. синтетише остеокалцин истог типа као и зрела кост (Endo, 2008).

Експресија остеокалцина истраживана је код бенигних неоплазми хороидног плексуса, папилома ХП, који су веома често удружени са формирањем ПТ. Папиломи хороидног плексуса (ПХП) су бенигни тумори који настају у можданим коморама и клинички се најчешће презентују хидроцефалусом. Папиломи хороидног плексуса често су удружени са калцификацијама, док је код двадесетак случајева забележених у литератури описана права осификација (Manjila, 2013). Осификација је најчешће била присутна у папиломима који су били локализовани у четвртој можданој комори. Сличну радилошку презентацију показује и група интракранијалних лезија која се назива калцификујуће псеудонеоплазме неуроаксиса (CAPNON). Реч је бенигним ненеопластичним израслинама удружених са калцификацијом, чији хистолошки степен варира од псамоматозних телашаца до праве костне метаплазије, са развојем зрелих коштаных гредица (Aiken, 2009). Сматра се да би CAPNON могли представљати реакцију залечења, као што се остеогенеза у папиломима хороидног плексуса може сматрати самоизлечујућим механизмом у одговору на присуство туморских ћелија. Према овом ставу, осеална метаплазија резултат је реакције стромалних ћелија на абнормалне процесе или оштећење. Са друге стране, осификација у папилуму могла би бити резултат активације аберантних сигналних путева у тумору, што доводи до стварања фактора неопходних да индукују транзицију незреле мезенхимне ћелије у остеобласт. Порекло хороидног плексуса од неуроепителних ћелија током ембрионалног развоја указују на могућност поновне активације сигналних путева који промовишу остеогенезу. Томе доприноси и чињеница да се формирање костију свода лобање одвија путем интрамембранозне осификације, тј. истим механизмом као и осификација у папилуму. Елементи енхондралне осификације (хондроцити и хрскавичаво ткиво) нису никада забележени ни у папиломима нити код CAPNON. Микроскопска анализа ПХП са осификацијом показала је очувану структуру хороидног сплета са пролиферацијом свих слојева. Коштане трабекуле у овим туморима увек су у потпуности одвојене од епителне компоненте окружујућим слојем строме (Manjila, 2013). Овај хистолошки налаз иде у прилог тези да нису саме туморске ћелије те које се трансформишу у остеобласте и формирају кост, већ се то пре дешава са мезенхимним ћелијама из околине. Имунохистохемијским маркирањем мезенхимних ћелија виментином утврђено је да је број и густина виментин позитивних ћелија у строми ПХП са осификацијом значајно

већа у односу на неосификујуће ПХП (Manjila,2013). Ово може указивати на већи број прогениторских ћелија у којима је покренута диференцијација у правцу линије остеобласта.

Упадљиви изостанак имуноекспресије остеокалцина у околини псамоматозних телашаца указује на то да је процес осификације у папилому независтан и противно је теорији да псамоматозна телашца могу имати улогу језгра за иницијалну осификацију. Поред тога, аутори нису забележили ПТ заробљена у коштаном матриксу, што је аргумент против повезаности између стварања кости и ПТ. Међутим, с обзиром на то да су описани случајеви осификујућих ПХП били удружени са ПТ, не може се ни искључити могућност да ПТ могу функционисати као нидус за осификацију (Shintaku, 2008). Присуство остеокалцина у осификованим узорцима ПХП указује на то да се у туморима одвија стварање праве кости насупрот једноставној калцификацији. Експресија остеокалцина у ћелијама које окружују трабекуле говори у прилог присуства и остеобласта и остеоцита.

Основна разлика између осификујућих и неосификујућих узорака ПХП лежи у присуству трансформације остеопонтин-продукујуће ћелије, која је по природи незрела у остеокалцин-продукујућу ћелију, која се класично сматра зрелим остеобластом. Покретачима диференцијације из незрелог у зрели фенотип сматрају се BMP, али прецизна природа сигналних путева којима остварују своје дејство није позната. Услед склоности ткива нормалног хороидног плексуса да калцификује, као и да, у неким случајевима, ствара ектопичну кост, стиче се утисак да се ћелије хороидног плексуса предиспониране да развију секрецију BMP током развоја тумора. Стога се хетеротопично стварање кости одвија путем костне метаплазије покренуте ослобађањем BMP из трансформисаних ћелија хороидног плексуса (Manjila,2013). Мезенхимне матичне ћелије присутне у строми нормалних органа, али и строми тумора и имају потенцијал да се развијају у различита ткива (Mathews T, 1974, Manjila S, 2013). Диференцијација ових мезенхимних ћелија у остеобласте узрокује продукцију коштаных морфогенетских протеина (енгл. bone morphogenetic protein - BMP), фактора неопходних за формирање костног ткива. У претходном истраживању нађено је да све туморске ћелије осификованог карцинома колона експримирају BMP-5 и BMP-6, док су BMP-2 и BMP-4 присутни само у ћелијама које окружују огњишта осификације (Imai, 2001). Сматра се да експресија BMP-5 и BMP-6 индукује диференцијацију околних

мезенхимних ћелија у остеобласте који стварају BMP-2 и BMP-4. Додатни фактори неопходни за матурацију кости су Runx2 и osterix. Ишемија унутар туморског ткива може узроковати пролиферацију мезенхимних ћелија, стварајући незреле прекурсоре који даље могу сазревати у диферентоване ћелије попут остеобласта.

У патогенези биоминерализације и формирања ПТ све већи значај приписује се и нанобактеријама (Kajander и сар, 1998. и 2006; Ciftcioglu и сар, 1999). Оне су најпре описане као грам-негативни микроорганизми способни да стварају кристале калцијум-фосфата при неутралном рН и при физиолошким концентрацијама калцијума и фосфата. Ciftcioglu и сар 1999; Jones и сар, 2009; Miller и сар, 2004; Tsurumoto и сар, 2008) Ултраструктурном цитохемијском анализом нанобактерија верификовано је присуство нуклеинских киселина, али транскрипционе секвенце никада нису изоловане. Сматрају се најситнијим прокариотским организмима, док постоје и теорије да су нанобактерије заправо саморастући макромолекули. У ћелијској оне изазивају настанак луковичасто слојевитих, калцификованих структура, односно псамоматозних телашаца (Kajander и сар, 2006; Cisar и сар, 2000). Сматра се да игличаста калцијумска љуска која се формира око ових архибактерија представља слој биогеног апатита који се понаша као нидус око кога се одвија кристализација и на крају формира калцификовани депозит (Kajander, 1998, Ciftcioglu, 1999).

Недавно објављена студија анализирао је електрономикроскопски и електроспектроскопским имидингом микрокалцификације у људској плаценти (Pasquinelli и сар, 2010). Трансмисионом електрономикроскопијом узорака плаценте уочена су бројна округла, електроногуста телашца лоцирана у близини или у самој базалној мембрани синциотиотрофобласта. У односу на величину и ултраструктурну морфологију, две класе нанобактерија су препознате: лоптаста телашца величине 160нм нађена у екстрацелуларном матриксу или у базалној ламини, а њихово присуство је уочено и у цитоплазми појединих ћелија. Ова телашца су имала солидан изглед и нису показивала периферну триламинарну мембрану или омотач. У високој резолуцији њихов изглед је наликовао густо пакованој фибриларној организацији. Спектроскопска анализа је показала да ова телашца не садрже калцијум. Насупрот њима, телашца величине 500нм искључиво су била присутна у нивоу базалне ламине. Ове нанобактерије су имале организованији изглед. На великом увећању јасно се издвајају електроногусто језгро и концентрична електроногуста љуска са светлим хало регионом.

Електронспектроскопским имицингом документовано је присуство депозита калцијума у језгру и периферној љусци ових телашаца. Занимљиво, местимично се могла уочити деоба централног језгра. Ова велика телашца су коалесцирала и формирала типичне, ламелиране псамоматозне калцификације које су биле широко распрострањене у базалној ламини (Pasquinelli и сар, 2010).

Један од најзначајнијих примера појаве псамоматозних телашаца у малигној неоплазми јесте серозни папиларни цистаденокарцином јајника, који је у већој или мањој мери удружен са овим калцификацијама. У неким случајевима, овај карцином је удружен са енормним бројем псамоматозних телашаца, те се због упечатљиве хистолошке слике и назива псамоматозним карциномом јајника. Sedivy и Battistutti су у ПТ оваријалног аденокарцинома идентификовали нанобактеријске антигене путем имунохистохемије, а свој налаз потврдили електрономикроскопском и спектрометарском анализом. Присуство нанобактерија фокално су регистровали и у туморским ћелијама појединих суперфицијалних папила и у околини ПТ, док су сви остали делови тумора, околно очувано ткиво јајника, као и узорци цистаденокарцинома без ПТ били негативни. Код свих испитиваних случајева оваријалног карцинома са ПТ, аутори су у узорцима асцитне течности успели да докажу присуство нанобактеријских протеина. Њихови резултати указали су на повезаност нанобактерија и налаза ПТ у серозном папиларном цистаденокарциному јајника и сугерисали могућу улогу нанобактерија у патогенези канцера асоцираних са ПТ (Sedivy R, 2003). Hudelist и сарадници су детектовали нанобактеријске протеине имунохистохемијски и путем реверзна транскриптаза-полимеразне ланчане реакције (RT-PCR) у псамоматозним телашцима оваријалних аденокарцинома у 100% испитиваних случајева, док ни један од ПТ негативних карцинома није био позитиван. Поред тога, нанобактеријска mRNA нађена је у свим узорцима аденокарцинома који су садржали ПТ. На бази експерименталних доказа, они су закључили да нанобактеријска инфекција у малигном оваријалном ткиву доприноси процесу биоминерализације и стварања калцификованих депозита у форми ПТ (Hudelist и сар, 2004).

Лоцирани унутар можданих комора хороидни плексуси улазе у састав крвно-ликворне баријере, која, за разлику од крвно-мождане, одржава своја баријерна својства кроз слој једноредног епитела уместо кроз ендотел, који је фенестриран и дозвољава велику пермеабилност супстанцама ношеним крвљу. Како би се спречио

неконтролисани улазак супстанција из циркулације из унутрашње строме ХП у ЦСТ, епител ХП опремљен је тесним везама које функционално сазревају још од раног ембрионалног развоја, како би спречиле пасивну дифузију из крви (Johanson и сар, 2008; Johanson и сар, 2011). Епителне ћелије ХП секретују ЦСТи на тај начин увеликој мери доприносе одржавању хомеостазе мозга, ошучвању интракранијалног притиска и снабдевању паренхима ЦНС-а микронутријентима (Strazielle и Ghersi-Egea, 2000). Васкуларне ендотелне ћелије ХП су јединствене по томе што не поседују тесне међућелијске везе, те омогућују далеко лакшу дијапедезу ћелија из периферне крви у строму ХП, на супрот посткапиларним венулама крвно-мождане баријере у паренхиму, код којих је неопходан пролазак ћелија кроз две базалне мембране. Поред тога што представља место уласка имуних ћелија из циркулације у ЦНС, ХП је такође домаћин локалне популације антиген презентујућих ћелија (Williams и сар, 2014.)

У физиолошком стању мировања, астроцити и имикроглија учествују у одржавању хомеостазе нервног ткива, обезбеђујући нервном паренхиму потпорну неуротрофичну средину. Када дође до оштећења у ЦНС-у, умируће ћелије и акумулација ћелијског дебрија активира мирујућу микроглију и астроците. Активисана микроглија фагоцитије ћелијски детритус и истовремено секретује токсична једињења, укључујући проинфламаторне цитокине, као што су IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6, и реактивне врсте кисеоника и азота. Сигнални молекули који се ослобађају у паренхиму, попут TNF- $\alpha$ , долазе до ХП путем ЦСТ, где бивају препознати од стране цитокинских и Toll-like рецептора (TLR) на епителним ћелијама ХП. Заједно са интерфероном гама кога секретују стромалне Th1 ћелије, ови сигнали покрећу каскаду ћелијског кретања Т лимфоцита и моноцита који улазе из периферне крви кроз ХП. Ова каскада укључује низ молекуларних догађаја који омогућују селективно регрутовање леукоцита у ЦНС. Овде спадају усходна регулација и повећана експресија интегринских рецептора, попут ICAM-1, хемокина (CXCL10) и површинских ензима (CD73) на епителним ћелијама ХП. У току процеса репарације, макрофаги настали из моноцита и регулаторне Т ћелије накупљају се у инфламраним деловима ЦНС-а и супримирају запаљенски одговор тако што секретују антиинфламаторне цитокине, као што су IL-10 and TGF- $\beta$ . У хроничним неуродегенеративним болестима, циркулишуће имуне супресорске ћелије, као што су регуларне Т ћелије и мијелоидне супресорне ћелије одржавају периферну имуносупресију и инхибирају пролазак имуних ћелија у ЦНС. Пошто изостаје подршка циркулишућих леукоцита који разрешавају запаљење, умируће ћелије, ћелијски

детритус и протеински агрегати који се акумулирају на локалном нивоу активирају астроците и микроглију и успоставља се деструктивни, зачарани круг локалне токсичности. Неурони који се нађу у оваквој инфламаторној микросредини подлежу дегенерацији и апоптози (Varuch и сар, 2014; Schwartz и Varuch 2014).

У физиолошким условима Т-ћелије се на територији мозга углавном могу наћи у ЦСТ, хороидном плексусу и менингеалним просторима (Engelhardt и Ransohoff, 2005). На овим локацијама Т-ћелије се могу сусрести са својим антигенима, а које им представљају локалне антиген-презентујуће ћелије (Kivisakk и сар, 2009; Derecki и сар, 2010; Anandasabapathy и сар, 2011; Varuch и сар, 2013). У строми ХП у здравом мозгу ЦНС-специфични CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцити присутни су у току читавог животног века. Оваква њихова просторна и временска дистрибуција указује да ове ћелије имају медијаторну улогу путем које делују на ЦНС.

Теорија протективног аутоимунитета је нови концепт имуног надзора ЦНС-а, који аутоимуним ЦНС-специфичним CD4<sup>+</sup> Т-ћелијама приписује корисне улоге у одржавању и репарацији здравог мозга, а ХП поставља у централно место збивања. Неуропротективни капацитет аутоимуних ћелија демонстриран је у бројним моделима различитих болести ЦНС-а, укључујући механичке повреде, хроничне неуродегенеративне болести и поремећаје нивоа неуротрансмитера (Ling и сар, 2006; Laurie и сар, 2007; Mosley и сар, 2007; Schori и сар, 2001). Штавише, у здравом мозгу аутоимуне CD4<sup>+</sup> Т-ћелије имају улогу у одржавању пластичности неурона, укључујући неурогенезу и просторно учење и меморију (Ziv и сар, 2006; Radjavi и сар, 2014). Испитивање потенцијалног механизма којим ове ћелије обављају своју неуропротективну улогу у експерименталним моделима трауме ЦНС-а и неуродегенерације, нагласило је способност Т-лимфоцита да контролишу инфламацију у ЦНС-у, у својству учесника шире ћелијске мреже. Протективни аутоимунитет представља есенцијални физиолошки механизам за заштиту ЦНС-а, његов опоравак и одржавање у условима здравља и болести. Према томе, аутореактивне Т ћелије не одражавају нужно дисфункцију имуног система, као што се првобитно сматрало. Добро контролисани процес стварања и активације ЦНС-специфичних Т-ћелија је сврсисходан процес, и само у условима његове дисрегулације ове ћелије постају деструктивне. Овај модел коси се са догматским становиштем да у телу морају у потпуности да буду уништене све аутореактивне ћелије и сугерише да је одговор против сопственог од

водећег значаја за одржавање равнотеже у ЦНС-у и да захтева далеко строжу контролу од одговора на стране антигене (Schwartz и Baruch 2014).

Тек је недавно установљено да ЦНС-специфичне Т-ћелије имају способност да појачају прилив и накупљање антиинфламаторних макрофага, насталих из моноцита периферне крви, у оштећену кичмену мождину (Shechter et al, 2009). Микроглија и ЦНС-инфилтришући макрофаги настали из моноцита циркулишуће крви представљају морфолошки и функционално сличне, али ипак две специфичне и особене популације ефекторних, фагоцитних ћелија ЦНС-а (Schwartz и Baruch 2014). Микроглија представља популацију мијелоидних ћелија које насељавају ЦНС и дистрибуиране су у различитим регионима мозга, кичмене мождине и ретине. Тек недавно је откривено да микроглија има различито порекло од макрофага који настају из моноцита периферне крви и инфилтришу мозак у патолошким околностима (Ginhoux и сар, 2010). Микроглија води порекло од ћелија жуманцетне кесе (yolk sac), које насељавају ЦНС током раног развоја и имају надзорну улогу у одржавању хомеостазе мозга. Микроглија има ограничену способност самообнављања (Hanisch и Kettenmann, 2007; Saijo и Glass, 2011). У условима акутне и хроничне неуроинфламације, мијелоидне ћелије из периферне крви које долазе у оштећени ЦНС деле многе фенотипске и морфолошке карактеристике са активисаном микроглијом. Током протекле две деценије, интензивна истраживања открила су да инфилтришући макрофаги који настају из моноцита периферне крви не припадају популацији микроглије и, да у поређењу са микроглијом, ови инфилтришући макрофаги имају већи фагоцитни капацитет, пружају бољу неуротропну потпору и имају израженија антиинфламаторна својства (Shechter и сар, 2009; Jung и Schwartz, 2012; London и сар, 2013). Потенцијално корисна улога макрофага из крви демонстрирана је у различитим патолошким стањима у ЦНС-у, од акутних инzulта до неуродегенеративних болести и нероразвојних менталних поремећаја (Shechter и Schwartz, 2013).

Докази да макрофаги настали из моноцита играју важну улогу у одговору на неуроинфламацију најпре су добијени у експерименталним студијама на моделу оштећења кичмене мождине. Студије су показале да алтернативно активисани макрофаги крви, када се локално трансплантирају на ивицу лезије кичмене мождине, доводе до побољшаног опоравка (Rapalino и сар, 1998). Успех овакве трансплантације макрофага зависи од места њиховог убризгавања, тј. ефекта нема када се активисани



макрофаги трансплантирају у центар лезије или далеко од маргина оштећења, затим од броја инјектованих ћелија и времена које је протекло између оштећења и убацивања макрофага (Schwartz и Yoles, 2006). Коришћењем анималног модела, миша са химеричном костном сржи, што је омогућило диференцијацију између активисане микроглије и ЦНС инфилтришућих макрофага пореклом из моноцита периферне крви, као и њихове селективне аблације, откривено је да инфилтришуће ћелије показују локални анти-инфламаторни фенотип, који критично зависи од њихове експресије интерлеукина 10, кључног фактора који супримира активност микроглије (Shechter и сар, 2009). Улога регрутованих макрофага у разрешавању запаљења је даље доказана и описана у моделу инzulта ретине. У овом моделу је показано да макрофаги настали из моноцита крви инфилтришу оштећену мрежњачу и стимулишу самообнављање и опстанак ћелија, мењајући миље проинфламаторних цитокина (London и сар, 2011). У мурином моделу Алцхајмерове болести, методологијом условне аблације и реконституције, показано је да стварање плакова од амилоида бета у оболелом мозгу може бити ублажено помоћу макрофага који долазе из крви (Simard и сар, 2006; Butovsky и сар, 2007; Town и сар, 2008). Смањење оптерећења амилоидним плаковима је у корелацији са застојем локалног неуроинфламаторног одговора, редукцијом нивоа проинфламаторних цитокина и локалним повишењем неуротрофичних фактора. Неуропротективни ефекат циркулишућих мијелоидних ћелија приказан је применом разноврсних стратегија замена микроглије на мурином моделу за Ретов синдром (Derecki и сар, 2012). Занимљиво је да ЦНС инфилтришући макрофаги пореклом из моноцита крви поправљају абнормално понашање код Нохb8 мутантног миша, који је експериментални модел за опсесивно-компулсивни поремећај (Chen и сар, 2010).

Поред тога што представља место уласка имуних ћелија из циркулације у ЦНС, ХП је такође домаћин локалне популације антиген презентујућих ћелија (Williams и сар, 2014). У ХП човека и експерименталних животиња (мишева и пацова) идентификовано је присуство дендритичних ћелија које експримирају рецепторе главног хистокомпатибилног комплекса класе II (МНС II) и презентују антгене циркулишућим лимфоцитима (McMenamin, 1999). Ове дендритичне ћелије узоркују околину екстендирањем својих продужетака између околних епителних ћелија ХП и на тај чине ХП важном локацијом имунолошког развоја (Serot и сар, 2000). Локализација ових антиген презентујућих ћелија у непосредној близини крвних судова ХП указује на то да ове ћелије експримирају групу хемокина која ограничава њихову мобилност ван овог

компартамана. Поред тога, промет дендритичних ћелија и њихово лимитирано трајање диктира да оне екскретују локализационе сигнале који олакшавају њихово повлачење из циркулације у ХП (Chinnery и сар, 2010). Дендритичне ћелије експримирају рецепторе за неколико хемокина, укључујући CXCR3, CCR6, CCR7 и CXCR4, као и још неколико других, у зависности од стадијума њихове матурације (Clarkson и сар, 2012). Међутим, није познато који хемокини учествују у одржавању дендритичних ћелија унутар ХП током имуног надзора. У условима хомеостазе присуство ових ћелија у строми ХП вероватно је обезбеђено константним нивоом цитокина који су стално присутни у микроколини, попут CCL19, CCL20 и CCL21. Презентација антигена од стране зрелих дендритичних ћелија и њихово препознавање Т-ћелијским рецепторима (TCR), доводи до хетеродимеризације између TCR и CXCR4, што је неопходно за активацију, секрецију цитокина и Т-ћелијску миграцију. Поред тога, CXCL12 појачава Т ћелијску реактивност јер костимулише Т-ћелијски рецептор, указујући на то да експресија CXCL12 у периваскуларној ниши може играти важну улогу у посредовању активације TCR током презентације антигена (Smith и сар, 2013). Хетеродимеризација TCR и CXCR4 покреће TCR сигнални пут преко  $\beta$ -arrestin-1 који доводи до нисходне регулације CXCR4, што вероватно ограничава деловање CXCL12 и спречава продужено задржавање Т-лимфоцита у периваскуларним просторима (Schneid и сар, 2009; Fernández-Arenas и сар, 2014; Williams и сар, 2014).

Хороидни плексус је компартам који је од кључног значаја за целоживотно одржавање ЦНС-а, те се промене које се у ХП јављају са старењем реперкутују на морфофункционално стање ЦНС-а. Изучавањем ХП код остарелих мишева откривено је да са старењем долази до великих промена у равнотежи ефекторских цитокина, као и да промене у строми ХП у великој мери одражавају промене у периферном имунитету. Стога, ХП остарелих организама показује снажну склоност ка Th2 ефекторском одговору (Baguch и сар, 2013), што одражава стање у циркулацији током старења, и представља драстичну промену од Т хелперског одговора према Th2 типу (Shearer, 1997; Rink и сар, 1998). Померање локалног баланса цитокина у старом ХП покреће стварање хемокина CCL11 у епителним ћелијама, који се повезује са когнитивном дисфункцијом удруженом са старошћу. Ниво IFN- $\gamma$  опонира овај ефекат (Baguch и сар, 2013; Villeda и сар, 2011; Villeda и Wyss-Coray, 2013). Недавно је откривено да циркулишуће ћелије које продукују IFN- $\gamma$  имају есенцијалну улогу у активацији ХП да дозволи пролазак леукоцита (Kunis и сар, 2013).

Имунолошка дисфункција хороидног плексуса која се развија са старењем негативно утиче на когнитивне функције и хипокампаљну нурогенезу (Вагуч и сар, 2015). Порекло и улоге сигнала који у телу које стари обликују функцију мозга још увек нису расветљени. Хороидни плексус, интегрални део крвно-ликворне баријере, препознат је као тачка приступа, односно интерфејс континуираног дијалога између можданог ткива и леукоцита из крви. Откривање механизма регулације који управљају функционалним променама ХП у току старења могли би да омогуће идентификацију нових стратегија за ублажавање когнитивног пропадања удруженог са старењем. Коришћењем мулти-органске анализе целокупног генома младих и остарелих мишева, Вагуч и колеге утврдили су да се старење ХП карактерише јединственим имунолошким отиском интерферонског одговора типа (IFN-I). Овакав специфичан имунопрофил нађен је и у анализираним хуманим ХП. Раздвајањем процеса старења имуног система од процеса старења мозга, коришћењем модела хетерохроничне парабиозе младих и остарелих мишева, даље је пронађено да је овај интерферонски одговор индукован сигналима који настају у самом мозгу и присутни су у ЦСТ. Блокада IFN-I сигнализације у остарелом мозгу доводи до делимичног опоравка когнитивних функција и хипокампаљне неурогенезе, и поновног успостављања активности ХП које се са старењем гасе.

Интерферони представљају велику групу протеина откривену 1957. године, који су углавном укључени у заштиту од вирусних инфекција (Schultz и сар, 2004). Претходна истраживања указала су на повезаност прекомерне продукције интерферона типа I (IFN-I) у централном нервном систему и поремећаја памћења у неколико неуроинфламаторних болести човека (Samarajiva и сар, 2006). Поред тога, неуролошке и неуропсихијатријске компликације се често бележе код пацијената са хроничним вирусним хепатитисом С и канцером који се лече интерфероном алфа (IFN- $\alpha$ ). Недавно објављена студија показала је да је старење удружено са прекомерном активношћу интерферон типа I система (IFN-I) на нивоу хороидног плексуса, који представља приступну тачку (интерфејс) између мозга и циркулације. Истраживачи су у овој студији пронашли корелацију прекомерне експресије интерферона типа I (IFN-I) у хороидном плексусу миша и човека и старења, анализирајући постмортем пресеке мозга особа преминулих од узрока неvezаних за ЦНС. Ова прекомерна експресија се јављала са старењем и покренута је сигналима из можданог ткива, присутним у цереброспиналној течности (Вагуч и сар, 2014).

Varugh и колеге су такође показали да третман епителних ћелија ХП интерфероном бета (IFN- $\beta$ ), кључним представником IFN-I фамилије цитокина, супримира експресију инсулину сличног фактора раста (IGF1) и можаног неуротрофичног фактора (BDNF - brain derived neurotrophic factor), молекула који су од есенцијалног значаја за раст и преживљавање неурона. Убризгавање неутрализујућих антитела на IFN-I рецептор ( $\alpha$ -IFNAR) опонира сигнализацију интерферон типа I молекуларног пута у мозгу, што омогућава да се опет успоставе оштећене когнитивне функције код миша. Ово је праћено појачаном хипокампаалном неурогенезом и експресијом антиинфламаторног цитокина интерлеукина-10, и смањењем астроглиозе и микроглиозе. Стога, поред важног закључка да се у старењу повећава IFN-I одговор, ова студија указује на то да неутрализација типа I интерферонског одговора у ЦНС-у може представљати нови терапијски приступ у контроли и превенцији опадања когнитивних функција, која је удружена са старењем (Varugh и сар, 2014).

Промене повезане са старењем се критично испољавају у цитокинском миљеу ХП. Када није адекватно избалансиран интерфероном гама, висок ниво IL-4 индукује епителне ћелије ХП на стварање CCL11, хемокина удруженог са когнитивним поремећајима повезаним са старењем, који се акумулира у ЦСТ (Villeda и сар, 2011; Stevenson и сар, 2009). Са друге стране, неке студије су показале да IL-4 има корисну улогу у учењу и памћењу, те да се због когнитивних задатака у ЦНС-у акумулирају IL-4-продукујуће ћелије (Derecki и сар, 2010). Овакви налази наглашавају да IL-4 има дуалну улогу у ЦНС-у, која може зависити од просторне локализације и дозе овог цитокина. У складу са тим, стварање CCL11 у епителним ћелијама ХП може да доводи до оштећења мождане функције тако што супримира секрецију IL-4 пореклом из можданих опни (Ransohoff, 2011). Међутим, извесно је да не само менингеални IL-4, већ и онај који се производи у самом ХП одржава пластичност мозга. Зато је стварање IL-4 у ХП део целоживотне улоге овог компартмана у одржавању хомеостазе ЦНС-а.

## 6. ЗАКЉУЧАК

- Морфолошке промене удружене са старошћу су: смањена разгранатост хороидног плексуса, измењен епител (куполасте високе ћелије које епителу дају зупчаст изглед, спљоштене вретенасте ћелије, велике ћелије испуњене вакуолама или пенушавим садржајем), смањена целуларност строме, појава већих групација ПТ, често унутар цистичних структура
- У строми вилуса хороидног плексуса присутне су ћелије које експримирају CD68, маркер моноцитно-макрофагне лозе. Густина CD68 имунопозитивних ћелија највећа је у близини псамоматозних телашаца. Ове ћелије могле би бити бар једним делом одговорне за продукцију и секрецију остеопонтин, који је присутан у ПТ.
- Ћелије које испољавају имунопозитивност на CD44 уочене су у строми чупица хороидног плексуса и фенотипски одговарају ћелијама фибробластне диференцијације. Највећа густина CD44 имунопозитивних ћелија забележена је у непосредној близини псамоматозних телашаца, а у малом броју случајева уочено је да ћелије које експримирају CD44 интимно налажу на ПТ, препокривајући њихову површину.
- Зреле и незреле форме псамоматозних телашаца у највећем броју случајева показују имунопозитивност на остеопонтин, док у амилоидним депозитима присуство остеопонтин није детектовано. Ниво остеопонтинске експресије у ПТ одликовао се великом хетерогеношћу, те је уочено неколико могућих образаца имунохистохемијске реакције на остеопонтин, од потпуне позитивности са браон пребојавањем целог псамоматозног корпускула, преко интермедијарних форми до, најређе опсервираног, потпуно негативног облика.
- Доминантан налаз остеопонтинске експресије у зрелим, ламелираним ПТ било је хомогено, интензивно пребојавање централног дела ПТ, док је у периферним ламелама експресија забележена у неким од концентричних, прстенастих слојева, што је уз наизменично смењивање са плавим, на

остеопонтин негативним слојевим, телашцима давало карактеристичан изглед мете.

- Имунопозитивност на остеокалцин забележена је у зрелим и незрелим ПТ, као и у амилоидним депозитима, аморфним калцификацијама, где се могла видети у форми дискретног, периферног и ивичног пребојавања. Зреле и незреле форме ПТ показивале су сличне обрасце експресије остеокалцина, који су се одликовали значајном хетерогеношћу. Доминантан налаз позитивне имунохистохемијске реакције на остеокалцин манифестовао се конзистентним пребојавањем централног дела сферичне формације, док су околни, спољашњи слојеви показивали мање или више изражену имунореакцију на остеокалцин, или је она била у потпуности одсутна.
- Површинска густина хороидног плексуса и запреминска густина крвних судова хороидног плексуса опада са животном доби у све четири мождане коморе. Промене на крвним судовима хороидног плексуса у трећој и четвртој можданој комори се дешавају у ранијој животној доби, већ у средњим годинама.
- Са старошћу расту сви морфометријски параметри величине епителних ћелија хороидног плексуса, као и њихових једара (ареа, периметар, Феретов дијаметар), уз пораст неуклео-цитоплазматског односа. Осим тога, епителне ћелије бивају спљоштеније, а и сама њихова једра попримају неправилнији облик.
- Са старошћу, долази до пораста нумеричке и запреминске густина ПТ, већа је укупна арена ПТ, као и арена појединачних ПТ, њихов периметар и Феретов дијаметар. Због фузије више мањих ПТ, у старијој животној доби она имају мање правилан облик. Стварње ПТ је најизраженије у хороидним плексусима латералних можданих комора.
- Повећана експресија остеопонтина у ПТ је карактеристика млађе животне доби. Доминација имунонегативности ПТ се јавља око 50. године живота. ПТ се са годинама увећавају стварањем нових ламела које су имунонегативне на остеопонтин, односно увећава се њихова арена, периметар и Феретов дијаметар.

- Имунопозитивност на остеокалцин је карактеристика старије животне доби. Број ПТ са позитивном реакцијом на остеокалцин се равномерно повећава са старењем. ПТ са централном имунопозитивношћу настају у старијој животној доби.





## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Aguzzi A, Rajendran L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions and prionoids. *Neuron*. 2009; 64: 783–90.
2. Aiken AH, Akgun H, Tihan T, Barbaro N, Glastonbury C. Calcifying pseudoneoplasms of the neuraxis: CT, MR imaging, and histologic features. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30: 1256–60.
3. Albeck MJ, Skak C, Nielsen PR, Olsen KS, Borgesen SE, Gjerris F. Age dependency of resistance to cerebrospinal fluid outflow. *J Neurosurg* 1998; 89: 275–8.
4. Alvira-Botero X, Carro EM. Clearance of amyloid-beta peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci* 2010; 3: 219–29.
5. Anandasabapathy N, Victora GD, Meredith M, Feder R, Dong B, Kluger C, Yao K, Dustin ML, Nussenzweig MC, Steinman RM, Liu K. Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain. *J Exp Med* 2011; 208: 1695–705.
6. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Pre and post translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal* 2011; 5: 111-22.
7. Anderton BH. Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 811-7.
8. Antebi A. The tick-tock of aging? *Science* 2005; 310: 1911-3.
9. Arikök AT, Onder E, Seçkin H, Kaçar A, Fesli R, Oğuz AS, Alper M. Osteopontin expressions correlate with WHO grades and predict recurrence in meningiomas. *Brain Tumor Pathol* 2014; 31: 94–100.
10. Bai Y, Zhou G, Nakamura M, Ozaki T, Mori I, Taniguchi E, Miyauchi A, Ito Y and Kakudo K. Survival impact of psammoma body, stromal calcification, and bone formation in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2009; 22, 887–94.
11. Balestreri L, Canzonieri V, Morassut S. Calcified gastric cancer-CT findings before and after chemotherapy. Case report and discussion of the pathogenesis of this type of calcification. *Clin Imaging*. 1997; 21: 122-5.
12. Banizs B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, Bell PD, Schwiebert EM, Yoder BK. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 2005; 132: 5329–39.
13. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljković D, Ellwart JW, Klinkert WE, Flügel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H, Flügel A. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 2009; 462: 94–8.
14. Baruch K, Deczkowska A, David E, Castellano JM, Miller O, Kertser A, Berkutzki T, Barnett-Itzhaki Z, Bezalel D, Wyss-Coray T, Amit I, Schwartz M. Aging. Aging-induced

- type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science* 2014; 346: 89-93.
15. Baruch K, Deczkowska A, Schwartz M. Age-associated immunological dysfunction of the brain's choroid plexus negatively affects cognition and hippocampal neurogenesis. *Brain, Behavior and Immunity* 2015; 49 (Suppl ): e5
  16. Baruch K, Ron-Harel N, Gal H, Deczkowska A, Shifrut E, Ndifon W, Mirlas-Neisberg N, Cardon M, Vaknin I, Cahalon L, Berkutzki T, Mattson MP, Gomez-Pinilla F, Friedman N, Schwartz M. CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 2264–9.
  17. Baruch K, Schwartz M. CNS-specific T cells shape brain function via the choroid plexus. *Brain Behav Immun* 2013; 34: 11–6.
  18. Beck JC. *Geriatrics review syllabus*. 5th edition 2002. Blackwell publishing p. 1.
  19. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547–81.
  20. Bellows CG, Reimers SM, Heersche JN. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Res*. 1999; 297: 249–59.
  21. Benarroch EE. Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications. *Neurology* 2011; 77: 1198-204.
  22. Bersani G, Garavini A, Taddei I, Tanfani G, Pancheri P. Choroid plexus calcification as a possible clue of serotonin implication in schizophrenia. *Neurosci Lett* 1999; 259: 169-72.
  23. Beschorner R, Schittenhelm J, Schimmel H, Iglesias-Rozas JR, Herberts T, Schlaszus H, Meyermann R, Wehrmann M. Choroid plexus tumors differ from metastatic carcinomas by expression of the excitatory amino acid transporter-1. *Hum Pathol* 2006; 37: 854-60.
  24. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
  25. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcineficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998; 23: 187–96.
  26. Bowman GL, Dodge H, Frei B, Calabrese C, Oken BS, Kaye JA, Quinn JF. Ascorbic acid and rates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16: 93–8.
  27. Brennan-Speranza TC, Conigrave AD. Osteocalcin: an osteoblast-derived polypeptide hormone that modulates whole body energy metabolism. *Calcif Tissue Int*. 2015; 96: 1-10.
  28. Brodbelt A, Stoodley M. CSF pathways: a review. *British Journal of Neurosurgery*, 2007; 21: 510–20.
  29. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 56–7.
  30. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damage as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002; 269: 1996–2002.
  31. Burdo JR, Connor JR. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *BioMetals* 2003; 16: 63–75.

32. Burzynski SR. Gene silencing - a new theory of aging. *Med Hypotheses* 2003; 60: 578-83.
33. Buseman CM, Wright WE, Shay JW. Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res* 2012; 730: 90-7.
34. Butchi NB, Woods T, Du M, Morgan TW, Peterson KE. TLR7 and TLR9 trigger distinct neuroinflammatory responses in the CNS. *The American Journal of Pathology* 2011; 179: 783-94.
35. Butovsky O, Kunis G, Koronyo-Hamaoui M, Schwartz M. Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 413-6.
36. Cameron RI, McCluggage WG. Extensive psammomatous calcification of the uterus and cervix associated with a uterine serous carcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 888-90.
37. Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 55: 805-28
38. Carey JR, Zou S. Theories of life span and aging. In: *Physiological basis of aging and geriatrics*.
39. Carrithers MD, Visintin I, Viret C, Janeway CS Jr. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 2002; 129: 51-7.
40. Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *The Journal of Neuroscience. The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2005; 25: 10884-93.
41. Catala M. Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebrospinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses. *Arch Anat Cytol Pathol* 1998; 46: 153-69.
42. Cerdá-Nicolás M. Meningiomas: morphologic and ultrastructural characteristics of psammoma bodies. *Arch Neurobiol (Madr)* 1992; 55: 256-61.
43. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology (Oxford)*. 2016; pii: kev410. In press
44. Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, Capecchi MR. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 2010; 141: 775-85.
45. Chinnery HR, Ruitenber MJ, McMenemy PG. Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69: 896-909.
46. Chinta SJ, Woods G, Rane A, Demaria M, Campisi J, Andersen JK. Cellular senescence and the aging brain. *Exp Gerontol* 2015; 68: 3-7.
47. Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis, *Microsc Res Tech* 2001; 52: 65-82.
48. Chodobski A, Wojcik B, Loh Y, Dodd KA, Szmydynger-Chodobska J, Johanson CE, Demers DM, Chun ZG, Limthong LP. Vasopressin gene expression in the rat choroid plexus, *Adv Exp Med Biol* 1998; 449: 59-65.
49. Cichy J, Puré E. The liberation of CD44. *J Cell Biol* 2003; 161: 839-43.

50. Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int.* 1999; 56: 1893–8.
51. Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, Swaim W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 11511–5.
52. Clarke E, Dewhurst K. An illustrated history of brain function. Sandford Publications, Oxford 1972.
53. Clarkson BD, Héninger E, Harris MG, Lee J, Sandor M, Fabry Z. Innate-adaptive crosstalk: how dendritic cells shape immune responses in the CNS. *Adv Exp Med Biol* 2012; 946: 309-33.
54. Clemmensen C, Smajilovic S, Wellendorph P, Brauner-Osborne H. The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPCR6A) receptor: from cloning to physiological function. *Br J Pharmacol* 2014; 171: 1129–41.
55. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 551–9, quiz 560–1.
56. Cohen RJ, Weinstein S, Robertson T, Sellner LN, Dawkins HJ, McNeal JE. Variant chromophobe renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 904–6.
57. Cornford EM, Varesi JB, Hyman S, Damian RT, Raleigh MJ. Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Exp Brain Res* 1997; 116: 399-405.
58. Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Borthwick GM, Turnbull DM: Cytochrome oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 265-72.
59. Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, Cowles A, Covington J, Egaas B, Harwood M, Hinds S, Press GA. Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR Imaging in healthy volunteers. *Neuroradiol* 2000; 216: 672–82.
60. Cserr HF. Physiology of the choroid plexus. *Physiol Rev* 1971; 51: 273–311.
61. Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 2013; 33: 4216–33.
62. Cushing H. Studies on the cerebro-spinal fluid. *J Med Res* 1914; 31: 1–19.
63. D’Ercole AJ, Ye P, O’Kusky JR. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* 2002; 36: 209–20.
64. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan* 2014; 3: 6.
65. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev* 2013; 93: 1847–92.
66. Das DK. Psammoma body: A product of dystrophic calcification or of a biologically active process that aims at limiting the growth and spread of tumor? *Diagn Cytopathol.* 2009; 37: 534–41.
67. Davidović M, Sevo G, Svorcan P, Milosević DP, Despotović N and Erceg P. Old age as a privilege of the "selfish ones" *Aging and Disease* 2010; 1: 139-46.
68. Davis JD, Tremont G. Neuropsychiatric aspects of hypothyroidism and treatment reversibility. *Minerva Endocrinol.* 2007; 32: 49–65.
69. Davson H, Segal MB. Physiology of the CSF and blood brain barriers. Boca Raton: CRC Press, 1996.

70. Demasio K, Canterino J, Ananth C, Fernandez C, Smulian J, Vintzileos A. Isolated choroid plexus cyst in low-risk women less than 35 years old. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1246–9.
71. Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnes KM, Cuihfield A, Lynch KR, Kipnis J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: A key role for IL-4. *J Exp Med* 2010; 207: 1067–80.
72. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SB, Guyenet PG, Kipnis J. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 2012; 484: 105–9.
73. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1998–2003.
74. Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yebenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiology of Aging* 2008; 29: 902–12.
75. Dilman VM, Revskoy SY, Golubev AG. Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integral theory of aging. *Int Rev Neurobiol* 1986; 28: 89-156.
76. Dohrmann GJ. The choroid plexus in experimental hydrocephalus. A light and electronmicroscopic study in normal, hydrocephalic, and shunted hydrocephalic dogs. *J Neurosurg* 1971; 34: 56–69.
77. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.
78. Dugan JM, Atkinson BF, Avitabile A, Schimmel M, LiVolsi VA. Psammoma bodies in fine needle aspirate of the thyroid in lymphocytic thyroiditis. *Acta Cytol* 1987; 31: 330–4.
79. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 5–36.
80. Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR. Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 5-20.
81. Effros RB. The immunological theory of aging revisited. In: *Handbook of theories of aging*. Bengtson VL, Silverstein M, Putney N (eds). 2nd edition, 2008. New York: Springer. pp. 163-78.
82. Eghbali-Fatourehchi GZ, Mödder UI, Charatcharoenwitthaya N, Sanyal A, Undale AH, Clowes JA, Tarara JE, Khosla S. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone*. 2007; 40: 1370-7
83. Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM, Saunders NR. Structural characteristics and barrier properties of the choroid plexuses in developing brain of the opossum (*Monodelphis Domestica*). *J Comp Neurol* 2003; 460: 451–64
84. Ellis DZ, Nathanson JA, Sweadner KJ. Carbachol inhibits Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in choroid plexus via stimulation of the NO/cGMP pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1685–93.

85. Emerich DF, Skinner SJM, Borlongan CV, Vasconcellos AV, Thanos CG. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *BioEssays* 2005; 27: 262-74.
86. Emerich DF, Vasconcellos AV, Elliott RB, Skinner SJM, Borlongan CV. The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1191-201.
87. Endo T, Ohta K, Kobayashi T. Expression and function of Cbfa-1/Runx2 in thyroid papillary carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2409-12.
88. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005; 26: 485-95.
89. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology* 2009; 31: 497-511.
90. Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 112-29.
91. Esiri MM. Ageing and the brain. *J Pathol* 2007; 211: 181-7.
92. Faraci FM, Kinzenbaw D, Heistad DD. Effect of endogenous vasopressin on blood flow to choroid plexus during hypoxia and intracranial hypertension. *Am J Physiol* 1994; 266: H393-8.
93. Fausett MB, Zahn CM, Kendall BS, Barth WH, Jr. The significance of psammoma bodies that are found incidentally during endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 180-3.
94. Ferenczy A, Talens M, Zoghby M, Hussain SS. Ultrastructural studies on the morphogenesis of psammoma bodies in ovarian serous neoplasia. *Cancer* 1977; 39: 2451-9.
95. Fernández-Arenas E, Calleja E, Martínez-Martín N, Gharbi SI, Navajas R, García-Medel N, Penela P, Alcamí A, Mayor F Jr, Albar JP, Alarcón B.  $\beta$ -Arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J*. 2014; 33: 559-77.
96. Ferrante F, Amenta F: Enzyme histochemistry of the choroid plexus in old rats. *Mech Ageing Dev* 1987; 41: 65-72.
97. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010; 142: 296-308.
98. Fink A, Tomlinson G, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasm. *Mod Pathol* 1996; 9: 816-20.
99. Fiorella RM, Isley W, Miller LK, Kragel PJ. Multinodular goiter of the thyroid mimicking malignancy: diagnostic pitfalls in fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol* 1993; 9: 351-5; discussion 355-7.
100. Fleet JC, Hock JM. Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of rats and humans by reverse transcription - polymerase chain reaction. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1565-73.
101. Fleming CE, Nunes AF, Sousa MM. Transthyretin: more than meets the eye. *Prog Neurobiol* 2009; 89: 266-76.

102. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging: An evolutionary perspective on immunoscience. *Ann NY Acad Sci* 2000; 908: 244-54.
103. Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 422-7.
104. Garma-Aviña A. Cytology of the normal and abnormal choroid plexi in selected domestic mammals, wildlife species, and man. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 283-92.
105. Garton MJ, Keir G, Lakshmi MV, Thompson EJ. Age-related changes in cerebrospinal fluid protein concentrations. *J Neurol Sci* 1991; 104: 74-80.
106. Ghabriel MN, Zdziarski IM, Leigh C, Vink R. Changes in the blood-CSF barrier in experimental traumatic brain injury. *Acta Neurochirurgica Supplement* 2010; 106: 239-45.
107. Gilles J. Guillemin,†,1 and Bruce J. Brew. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 75, 2004.
108. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330: 841-5.
109. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 1999; 52: 189-96.
110. Greenfield JG, Love S, Louis DN, Ellison D. Greenfield's Neuropathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 696.
111. Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids* 2008; 35:29-36.
112. Guarino V, Faviana P, Salvatore G, Castellone MD, Cirafici AM, De Falco V, Celetti A, Giannini R, Basolo F, Melillo RM, Santoro M. Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness. *J Clin Endocr Metab* 2005; 90: 5270-8.
113. Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A. Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience* 2004; 129: 947-55.
114. Gursoy G, Acar Y, Alagoz S, Ankara SB. Osteopontin: A multifunctional molecule. *J Med and Med Science.* 2010; 1: 055-60.
115. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 1997; 272: 18644-9.
116. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1387-94.
117. Harman D. Aging: Overview. Healthy aging for functional longevity: Molecular and cellular interactions in senescence. *Ann NY Acad Sci* 2001; 928: 1-21.
118. Harvey J, Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ. Leptin: a potential cognitive enhancer? *Biochemical Society Transactions* 2005; 33: 1029-32.
119. Harvey J, Solovyova N, Irving A. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Progress in Lipid research* 2006; 45: 369-78.

120. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69: 990–1047.
121. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol* 1998; 33: 639-53.
122. Herbold DR, Magrane DM. Calcifications of the benign endometrium. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 666–9.
123. Higashiyama M, Ito T, Tanaka E, Shimada Y. Prognostic significance of osteopontin expression in human gastric carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2007; 14: 3419–27.
124. Hill HS, Grams J, Walton RG, Liu J, Moellering DR, Garvey WT. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. *Horm Metab Res* 2014; 46: 341–7.
125. Hinman JD, Abraham CR. What’s behind the decline? The role of white matter in brain aging. *Neurochem Res* 2007; 32: 2023-31.
126. Hirota S, Asada H, Kohri K, Tsukamoto Y, Ito A, Yoshikawa K, Xu Z, Nomura S, Kitamura Y. Possible role of osteopontin in deposition of calcium phosphate in human pilomatricomas. *J Invest Dermatol.* 1995; 105: 138–42.
127. Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1003-8.
128. Hirota S, Ito A, Nagoshi J, Takeda M, Kurata A, Takatsuka Y, Kohri K, Nomura S, Kitamura Y. Expression of bone matrix protein messenger ribonucleic acids in human breast cancers: Possible involvement of osteopontin in development of calcifying foci. *Lab Invest* 1995; 72: 64–9.
129. Hirota S, Nakajima Y, Yoshimine T, Kohri K, Nomura S, Taneda M, Hayakawa T, Kitamura Y. Expression of bone-related protein messenger RNA in human meningiomas: possible involvement of osteopontin in development of psammoma bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 54: 698–703.
130. Hirota S, Nakajima Y, Yoshimine T, Kohri K, Nomura S, Taneda M, Hayakawa T, Kitamura Y. Expression of bone related protein messenger RNA in human meningiomas: possible involvement of osteopontin in development of psammoma bodies. *J Neuropathol Exper Neurol* 1995; 54: 698–703.
131. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003; 14: 32–42.
132. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* 2003; 425: 977–80.
133. Hudelist G, Singer C F, Kubista E, Manavi M, Mueller R, Pischinger K, Czerwenka K. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization. *Histopathology* 2004; 45: 633–7
134. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 2007; 87: 1175-213
135. Hunt JL, Barnes EL. Non-tumor-associated psammoma bodies in the thyroid. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 90–4.



136. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996; 317 ( Pt 1): 59-64.
137. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994; 300 (Pt 3): 723-8.
138. Hunter JM, Kwan J, Malek-Ahmadi M, Maarouf CL, Kokjohn TA, Belden C, Sabbagh MN, Beach TG, Roher AE. Morphological and pathological evolution of the brain microcirculation in aging and Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012; 7: e36893.
139. Ichikawa H, Imano M, Takeyama Y, Shiozaki H, Ohyanagi H. Involvement of osteopontin as a core protein in cholesterol gallstone formation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009; 16: 197-203.
140. Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska KA, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling SR, Noda M. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem.* 2001; 276: 13065-71.
141. Ikeda T, Furukawa Y, Mashimoto S, Takahashi K, Yamada M. Vitamin B12 levels in serum and cerebrospinal fluid of people with Alzheimer's disease. *Acta Psychiatr Scand* 1990. 82: 327-9.
142. Imai N, Iwai A, Hatakeyama S, Matsuzaki K, Kitagawa Y, Kato S, Hokari R, Kawaguchi A, Nagao S, Miyahara T, Itoh K, Miura S. Expression of bone morphogenetic proteins in colon carcinoma with heterotopic ossification. *Pathol Int* 2001; 51: 643-8.
143. Irby RB, McCarthy SM, Yeatman TJ. Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 512-23.
144. Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Weller RO, eds. *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours.* Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.
145. Ishida M, Amano S. Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 2004; 22: 415-29.
146. Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A. Expression of S100A2 and S100A6 in thyroid carcinoma. *Histopathology* 2005; 46: 569-75.
147. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010; 9: 119-28.
148. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease* Volume 1, Number 2; 2010; 72-4.
149. Johannessen JV, Sobrinho-Simões M. The origin and significance of thyroid psammoma bodies. *Lab Invest* 1980; 43: 287-96.
150. Johanson CE, Palm DE, Primiano MJ, McMillan PN, Chan P, Knuckey NW, Stopa EG. Choroid plexus recovery after transient forebrain ischemia: role of growth factors and other repair mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20: 197- 216.
151. Johanson CE, Stopa EG, McMillan PN. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 2011; 686: 101-31.

152. Johansson PA, Dziegielewska KM, Liddelw SA, Saunders NR. The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity. *BioEssays: news and reviews in molecular. Cellular and developmental biology* 2008; 30: 237–48.
153. Johansson PA. The choroid plexuses and their impact on developmental neurogenesis. *Front Neurosci* 2014; 8: 340.
154. Jones JA, Ciftcioglu N, Schmid JF, Barr YR, Griffith D. Calcifying nanoparticles (nanobacteria): an additional potential factor for urolithiasis in space flight crews. *Urology*. 2009; 73: 210 e11–13.
155. Jovanović I, Stefanović N, Antić S, Ugrenović S, Đinđić B, Vidović N. Morphological and morphometric characteristics of choroid plexus psammoma bodies during the human aging. *Ital J Anat Embryol* 2004; 109: 19-33.
156. Jovanović I, Ugrenović S, Antić S, Stefanović N, Mihailović D. Morphometric and some immunohistochemical characteristics of human choroids plexus stroma and psammoma bodies. *Microsc Res Tech* 2007; 70: 617-27.
157. Jovanović I, Ugrenović S, Vasović L, Cukuranović R, Stoiljković N. Morphometric characteristics of choroid plexus epithelial cells in cases with significantly different psammoma bodies' presence. *Microsc Res Tech* 2009; 72: 32-41.
158. Jovanović I, Ugrenović S, Vasović L, Petrović D, Cekić S. Psammoma bodies - friends or foes of the aging choroid plexus. *Med Hypotheses* 2010; 74: 1017-20.
159. Jovanović I, Ugrenović S, Vasović L, Stojanović I. Immunohistochemical and morphometric analysis of immunoglobulin light-chain immunoreactive amyloid in psammoma bodies of the human choroid plexus. *Anat Sci Int* 2014; 89: 71-8.
160. Jung C, Ou YC, Yeung F, Frierson HF Jr, Kao C. Osteocalcin is incompletely spliced in non-osseous tissues. *Gene* 2001; 271: 143–50
161. Jung S, Schwartz M. Non-identical twins - microglia and monocyte-derived macrophages in acute injury and autoimmune inflammation. *Front Immunol* 2012; 3: 89.
162. Kahle W, Frotscher M, eds. *Color Atlas of Human Anatomy, Vol. 3: Nervous System and Sensory Organs*. 6th edition. Stuttgart: Thieme; 2011.
163. Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95: 8274–9.
164. Kajander EO. Nanobacteria—propagating calcifying nanoparticles. *Lett Appl Microbiol*. 2006; 42: 549–52.
165. Kang DY, Kim KH, Kim JM, Kim SH, Kim JY, Baik HW, Kim YS. High prevalence of RET, RAS, and ERK expression in Hashimoto's thyroiditis and in papillary thyroid carcinoma in the Korean population. *Thyroid* 2007; 17: 1031–8.
166. Keep RF, Jones HC. A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Dev Brain Res* 1990; 56: 47–53.
167. Keller JN. Age-related neuropathology, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2006; 5: 1-13.
168. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either

- neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 2009, 29: 13435–44.
169. Kinoshita Y, Okudera T, Tsuru E, Yokota A. Volumetric analysis of the germinal matrix and lateral ventricles performed using MR images of postmortem fetuses. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 382-8.
170. Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep* 2011; 44: 619-34.
171. Kim MD, Cho HJ, Shin T. Expression of osteopontin and its ligand, CD44, in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2004; 151: 78-84.
172. Kim YS, Nam JS, Yeo DW, Kim KR, Suh SH, Ahn CW. The effects of aerobic exercise training on serum osteocalcin, adipocytokines, and insulin resistance on obese young males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 82: 686–94.
173. Kimelberg HK. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neurosci* 2004; 129: 851 – 60.
174. Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 663–9.
175. Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2009; 65: 457–69.
176. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM. Human cerebrospinal fluid central memory CD4 + T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8389–94.
177. Kiyozuka Y, Nakagawa H, Senzaki H, Uemura Y, Adachi S, Teramoto Y, Matsuyama T, Bessho K, Tsubura A. Bone morphogenetic protein-2 and type IV collagen expression in psammoma body forming ovarian cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 1723–30.
178. Klose HH. The significance of the relation between elastic fibers, blood vessels and psammoma body formation in meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1961; 9: 359–66.
179. Knuckey N, Finch P, Palm DE, Primiano MJ, Johanson CE, Flinders KC, Thomson NL. Differential neuronal and astrocytic expression of transforming growth factor beta isoforms in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Mol Brain Res* 1996; 40: 1– 14.
180. Kohno M, Matsutani M, Sasaki T, Takakura K. Solitary metastasis to the choroid plexus of the lateral ventricle. Report of three cases and a review of the literature. *J Neurooncol* 1996; 27: 47–52.
181. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1233-9.
182. Korostishevsky M, Malkin I, Trofimov S, Pei Y, Deng HW, Livshits G. Significant association between body composition phenotypes and the osteocalcin genomic region in normative human population. *Bone* 2012; 51: 688–94.
183. Korzhevskii DE. The formation of psammoma bodies in the choroid plexus of the human brain. *Morfologiya* 1997; 111: 46–9.

184. Kozlovskii OM, Lagubov AS, Kiparisov LN, Verbenko AA. Mechanism of formation of the psammoma bodies in serous adenocarcinoma of the ovaries. *Arkh Patol* 1978; 40: 25–32.
185. Kriglstein K, Strelau J, Shober A, Sullivan A, Unsicker K, TGF-h and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol (Paris)* 2002; 96: 25–30.
186. Kubota T, Hirano A, Sato K, Yamamoto S. Fine structure of psammoma bodies at the outer aspect of blood vessels in meningioma. *Acta Neuropathol* 1985; 66: 163–6.
187. Kubota T, Hirano A, Yamamoto S, Kajikawa K. The fine structure of psammoma bodies in meningocytic whorls. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984; 43: 37–44.
188. Kuhn W, Feichter GE, Beier K, Rummel HH, Abel U, Kaufmann M. Extent of psammoma carcinoma of the ovary—A clinical, DNA flowcytometric and morphometric image analysis study. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1990; 50: 597–604.
189. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease. Philadelphia, PA, USA: Saunders, Elsevier Inc; 2008; 8th ed.
190. Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Miller O, Berkutzki T, Schwartz M. IFN- $\gamma$ -dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain* 2013; 136: 3427–40.
191. Laurie C, Reynolds A, Coskun O, Bowman E, Gendelman HE, Mosley RL. CD4 + T cells from Copolymer-1 immunized mice protect dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2007; 183: 60–8.
192. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456–69.
193. Lehtinen MK, Bjornsson CS, Dymecki SM, Gilbertson RJ, Holtzman DM, Monuki ES. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease and therapy. *J Neurosci.* 2013; 33: 17553-9.
194. Lewitus GM, Schwartz M. Behavioral immunization: immunity to selfantigens contributes to psychological stress resilience. *Molecular Psychiatry* 2009; 14: 532–6.
195. Li J, Zhang H, Yang C, Li Y, Dai Z. An overview of osteocalcin progress. *J Bone Miner Metab* 2016; In press.
196. Li X, Liu K, Pan Y, Zhang J, Lv Q, Hua L, Wang Z, Li J, Yin C. Roles of osteopontin gene polymorphism (rs1126616), osteopontin levels in urine and serum, and the risk of urolithiasis: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 315043.
197. Liang L, Korogi Y, Sugahara T, et al. Normal structures in the intracranial dural sinuses: delineation with 3D contrastenhanced magnetization prepared rapid acquisition gradient-echo imaging sequence. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23: 1739 – 46.
198. Liddel SA, Dziegielewska KM, Vandeberg JL, Saunders NR. Development of the lateral ventricular choroid plexus in a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 7: 16.
199. Ling C, Sandor M, Suresh M, Fabry Z. Traumatic injury and the presence of antigen differentially contribute to T-cell recruitment in the CNS. *J Neurosci* 2006; 26: 731–41.
200. Liu Q, Zhang J, Tran H, Verbeek MM, Reiss K, Estus S, Bu G. LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 17.

201. LiVolsi VA, Mazzaferri EL, Schneider AB, et al. Papillary carcinoma In: Delellis RA, Lloyd RV, Heitz
202. Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL. Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2009; 15: 134–48.
203. London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 34.
204. London A, Itskovich E, Benhar I, Kalchenko V, Mack M, Jung S, Schwartz M. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *J Exp Med* 2011; 208: 23–39.
205. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 97-109.
206. Lu J, Kaur C, Ling EA. An immunohistochemical study of the intraventricular macrophages in induced hydrocephalus in prenatal rats following a maternal injection of 6-aminonicotinamide. *J Anat* 1996; 188: 491–5.
207. Lu JX, Qiang W, Yau WM, Schwieters CD, Meredith SC, Tycko R. Molecular structure of  $\beta$ -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*. 2013; 154: 1257-68.
208. Lüders E1, Steinmetz H, Jäncke L. Brain size and grey matter volume in the healthy human brain. *Neuroreport* 2002; 13: 2371–4.
209. Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16: 445-57.
210. Madathil SK, Evans HN, Saatman KE. Temporal and regional changes in GF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 2010; 27, 95–107.
211. Madhavi C, Jacob M. Light and electron microscopic structure of choroid plexus in hydrocephalic guinea pig. *Indian J Med Res* 1995; 101: 217–24.
212. Maki M, Hirota S, Kaneko Y, Morohoshi T. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in ovarian serous papillary cystadenocarcinoma: a possible association with calcification of psammoma bodies. *Pathol Int* 2000; 50: 531–5.
213. Manjila S, Miller E, Awadallah A, Murakami S, Cohen M, Cohen A. Ossified choroid plexus papilloma of the fourth ventricle: elucidation of the mechanism of osteogenesis in benign brain tumors. *J Neurosurg Pediatrics* 2013; 12: 13–20.
214. Marques F, Falcao AM, Sousa JC, Coppola G, Geschwind D, Sousa N, Correia-Neves M, Palha JA. Altered iron metabolism is part of the choroid plexus response to peripheral inflammation. *Endocrinology* 2009a; 150: 2822–8.
215. Marques F, Sousa JC, Coppola G, Falcao AM, Rodrigues AJ, Geschwind DH, Sousa N, Correia-Neves M, Palha JA. Kinetic profile of the transcriptome changes induced in the choroid plexus by peripheral inflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2009b; 29, 921– 32.

216. Marques F, Sousa JC, Coppola G, Geschwind DH, Sousa N, Palha JA, Correia-Neves M. The choroid plexus response to a repeated peripheral inflammatory stimulus. *BMC Neuroscience* 2009c; 10: 135.
217. Mathews T, Moossy J. Gliomas containing bone and cartilage. *J Neuropathol Exp Neurol* 1974; 33: 456-71.
218. Matušan-Ilijaš K, Damante G, Fabbro D, Dorđević G, Hadžisejdić I, Grahovac M, Marić I, Spanjol J, Grahovac B, Jonjić N, Lučin K. Osteopontin expression correlates with nuclear factor- $\kappa$ B activation and apoptosis downregulation in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 2011; 207: 104–10.
219. Maurizi CP. Choroid plexus portals and a deficiency of melatonin can explain the neuropathology of Alzheimer's disease. *Med Hy* 2010; 74, 1059–66.
220. Maxwell DS, Pease DC. The electron microscopy of the choroid plexus. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2: 467–74.
221. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM.* 2002; 95: 3-13.
222. McMenamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res* 2003; 313: 259-69.
223. McMenamin PG. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol* 1999; 405: 553-62.
224. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; 29: 58–69.
225. Merksamer PI, Liu Y, He W, Hirschey MD, Chen D, Verdin E. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany NY)* 2013; 5: 144-50.
226. Miletto-González KE, Chen S, Muthukumaran N, Saglimbeni GN, Wu X, Yang J, Apolito K, Shih WJ, Hait WN, Rodríguez-Rodríguez L. The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 6660-7.
227. Miller DS, Lowes S, Pritchard JB. The molecular basis of xenobiotic transport and metabolism in choroid plexus. "In *The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier*" (W. Zheng and A. Chodobski, Eds.). CRC Press, Boca Raton, 2005; pp 147–173.
228. Miller DS. Confocal imaging of xenobiotic transport across the choroid plexus. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 1811–24.
229. Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, Yagubyan M, Rodgers JC, Cockerill FR 3rd, Folk RL, Rzewuska-Lech E, Kumar V, Farrell-Baril G, Lieske JC. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287: H1115–24.
230. Mizokami A, Yasutake Y, Gao J, Matsuda M, Takahashi I, Takeuchi H, Hirata M. Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS One* 2013; 8: e57375.

231. Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol* 2006; 499: 565–82.
232. Mosley RL, Gordon PH, Hasiak CM, Van Wetering FJ, Mitsumoto H, Gendelman HE. Glatiramer acetate immunization induces specific antibody and cytokine responses in ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler* 2007; 8: 235–42.
233. Motohara T, Tashiro H, Miyahara Y, Sakaguchi I, Ohtake H, Katabuchi H. Long-term oncological outcomes of ovarian serous carcinomas with psammoma bodies: a novel insight into the molecular pathogenesis of ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Sci.* 2010; 101: 1550-6.
234. Mundy GR, Poser JW (1983) Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein in bone. *Calcif Tissue Int.* 1983; 35: 164–8.
235. Murshed M, Schinke T, McKeeMD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two Gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004; 165: 625–30.
236. Naeini RM, Yoo JH, Hunter JV. Spectrum of choroid plexus lesions in children. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 192: 32–40.
237. Narita K, Kawate T, Kakinuma N, Takeda S. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. *Traffic* 2010; 11: 287–301.
238. Narr KL, Sharma T, Woods RP, Thompson PM, Sowell ER, Rex D, Kim S, Asuncion D, Jang S, Mazziotta J, Toga AW. Increases in regional subarachnoid CSF without apparent cortical gray matter deficits in schizophrenia: Modulating eVects of sex and age. *Am J Psych* 2003; 160, 2169–80.
239. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; 477: 90-4.
240. Netter F. *Atlas of Human Anatomy, Professional Edition. 6th Edition* New York: Saunders; 2014.
241. Nielsen CM, Dymecki SM. Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus. *Dev Biol* 2010; 340: 430-7.
242. Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn S, Liu HC, Richard E, Bhatnagar V, Wu W, The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiol Rev* 2015; 95: 83–123.
243. Nickel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM, Vashishth D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic–inorganic interface in bone. *Langmuir* 2013; 29: 13873–82.
244. Nomiya T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, Heywood EB, Jones KL, Kawamori R, Cassis LA, Tschöp MH, Bruemmer D. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2877-88.

245. O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 2008; 5: 1-8.
246. Oi S. Classification of hydrocephalus: critical analysis of classification categories and advantages of "Multi-categorical Hydrocephalus Classification" (Mc HC). *Childs Nerv Syst* 27: 1523–1533, 2011.
247. Olivera Merlin PS, Leyva Bohorquez Pdel C, Martínez-Cruz R, Pina Canseco S, Hernandez P, Martínez-Cruz M, Sánchez Rubio M, Martínez Martínez L, Pérez-Campos E. A study on inorganic elements in psammomas from ovarian & thyroid cancer. *Indian J Med Res* 2012; 135: 217-20.
248. Oshio K, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir Suppl* 2003; 86: 525-8.
249. Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, Srinivas P, Chamouni A, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I, Karsenty G. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas–bone–testis axis. *J Clin Invest* 2013; 123: 2421–33.
250. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, Huang YY, Lee H, Srinivas P, Gao XB, Suyama S, Langer T, Mann JJ, Horvath TL, Bonnin A, Karsenty G. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell* 2013; 155: 228–41.
251. Quintela T, Marcelino H, Deery MJ, Feret R, Howard J, Lilley KS, et al. Sex-Related Differences in Rat Choroid Plexus and Cerebrospinal Fluid: A cDNA Microarray and Proteomic Analysis. *J Neuroendocrinol* 2016; In press.
252. Papadea C, Schlosser RJ. Rapid method for beta2-transferrin in cerebrospinal fluid leakage using an automated immunofixation electrophoresis system. *Clin Chem* 2005; 51: 464 – 70.
253. Parwani AV, Chan TY, Ali SZ. Significance of psammoma bodies in serous cavity fluid: A cytopathologic analysis. *Cancer* 2004; 102: 87–91.
254. Pascale CL, Miller MC, Chiu C, Boylan M, Caralopoulos IN, Gonzalez L, Johanson CE, Silverberg GD. Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is agedependent. *Fluids Barriers CNS* 2011; 8: 21.
255. Pasquinelli G, Papadopulos F, Nigro M. Nanobacteria and psammoma bodies: ultrastructural observations in a case of pathological placental calcification. *Ultrastruct. Pathol.* 2010; 34: 344-50.
256. Patterson-Buckendahl P, Sowinska A, Yee S, Patel D, Pagkalinawan S, Shahid M, Shah A, Franz C, Benjamin DE, Pohorecky LA. Decreased sensory responses in osteocalcin null mutant mice imply neuropeptide function. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32: 879–89.
257. Perry VH, Gordon S. Microglia and Macrophages. In *Immunology of the Nervous System* (R. W. Keane, W. F. Hickey, eds.), New York, NY, Oxford University Press, 1997; 155–72.
258. Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, Rawles JM, Zipursky RB, Lim KO. Quantitative magnetic resonance imaging study of changes in morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol* 1994; 51: 874–87.



259. Pi M, Chen L, Huang MZ, Zhu W, Ringhofer B, Luo J, Christenson L, Li B, Zhang J, Jackson PD, Faber P, Brunden KR, Harrington JJ, Quarles LD. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One* 2008; 3: journal pone 0003858.
260. Piura B, Rabinovich A, Yanai-Inbar I. Psammomacarcinoma of the peritoneum. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97: 231–4.
261. Poca MA, Sahuquillo J. Short-term medical management of hydrocephalus. *Expert Opin Pharmacother* 6: 1525–1538, 2005.
262. Popovich PG, Longbrake EE: Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat Rev Neurosci* 2008, 9: 481–93.
263. Prall F, Maletzki C, Linnebacher M. Microdensitometry of osteopontin as an immunohistochemical prognostic biomarker in colorectal carcinoma tissue microarrays: potential and limitations of the method in 'biomarker pathology'. *Histopathology* 2012; 61: 823-32.
264. Preston JE. Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 31–7.
265. Preston JE: Age-related reduction in rat choroid plexus chloride efflux and CSF secretion rate. *Soc Neurosci* 1991; 25: 697-8.
266. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15: 300–12.
267. Provencio JJ, Kivisakk P, Tucky BH, Luciano MG, Ransohoff RM. Comparison of ventricular and lumbar cerebrospinal fluid T cells in non-inflammatory neurological disorder (NIND) patients. *J Neuroimmunol* 2005; 163: 179–84.
268. PU, Eng C, eds. World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2004; pp 57–66.
269. Puchacz E, Lian JB, Stein GS, Wozney J, Huebner K, Croce C. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinology* 1989; 124: 2648–50.
270. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 2008; 28: 14537–45.
271. Pyo JS, Kang G, Kim DH, Park C, Kim JH, Sohn JH. The prognostic relevance of psammoma bodies and ultrasonographic intratumoral calcifications in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2013; 37: 2330-5.
272. Qazi FM, Geisinger KR, Barrett RJ, Hopkin's MB III, Holleman IL Jr. Cervicovaginal psammoma bodies. The initial presentation of the ovarian borderline tumor. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 564–6.
273. Radjavi A, Smirnov I, Kipnis J. Brain antigen-reactive CD4 (+) T cells are sufficient to support learning behavior in mice with limited T cell repertoire. *Brain Behav Immun* 2014; 35: 58–63.
274. Rall DP: The structure and function of the cerebrospinal fluid. In *Cellular Functions of Membrane Transport*. Hoffman J (Ed.), Prentice-Hall, NJ, USA 1964; 269-82
275. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 623–35.

276. Ransohoff RM. Ageing: Blood ties. *Nature* 2011; 477: 41–2.
277. Ransohoff RM. Immunology: in the beginning. *Nature* 2009; 462: 41–2.
278. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 1998; 4: 814–21.
279. Raz N, Rodrigue KM. Differential aging of the brain: Patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev* 2006; 30: 730–48.
280. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. C-C chemokine receptor6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009; 10: 514–23.
281. Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and barriers of the CNS* 2011; 8: 3.
282. Redzic ZB, Biringer J, Barnes K, Baldwin SA, Al-Sarraf H, Young JD, Cass CA, Barrand MA, Hladky SB. Polarised distribution of nucleoside transporters in rat brain endothelial and choroid plexus epithelial cells. *J Neurochem* 2005; 94: 1420–6.
283. Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr Top Dev Biol* 2005; 71: 1–52.
284. Ritter NM, Farach-Carson MC, Butler WT. Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 877–85.
285. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1101–11.
286. Russ JC, Dehoff RT. *Practical Stereology*. 2nd ed. New York: Springer Science & Business Media; 2012.
287. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 775–87.
288. Samarajiwa SA, Wilson W, Hertzog PJ. "Type I interferons: genetics and structure". In Meager A. *The interferons: characterization and application*. Weinheim: Wiley-VCH. 2006 pp. 3–34.
289. Sasaki A, Iijima M, Yokoo H, Shoji M, Nakazato Y. Human choroid plexus is a uniquely involved area of the brain in amyloidosis: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Brain Res* 1997; 755: 193–201.
290. Schneider OD, Weiss AA, Miller WE. Pertussis toxin signals through the TCR to initiate cross-desensitization of the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 2009; 182: 5730–9.
291. Schofield I. Theories of ageing. In: *Healthy ageing: Nursing older people*. Heath H, Schofield (eds). Trento: Mosby. 1999. pp. 21–9.
292. Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3398–403.

293. Schreiber G, Aldred AR, Jaworowski A, Nilsson C, Achen MG, Segal MB. Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus, *Am J Physiol* 1990; 258: R338–45.
294. Schultz U, Kaspers B, Staeheli P. The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 499–508.
295. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *The EMBO Journal* 2014; 33: 7–20.
296. Schwartz M, Yoles E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. *J Neurotrauma* 2006; 23: 360–70.
297. Scott DE, Van Dyke DH, Paull WK, Kozlowski GP. Ultrastructural analysis of the human cerebral ventricular system 3. The choroid plexus. *Cell Tiss Res* 1974; 150: 389–97.
298. Sedivy R, Battistutti WB. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. *APMIS*. 2003; 111: 951–4.
299. Seltzer V, Spitzer M. Psammoma bodies in papillary adenocarcinoma of the endocervix. *Int J Gynecol Pathol* 1983; 2: 216–21.
300. Serot JM, Béné MC, Faure GC. Choroid plexus, ageing of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci* 2003; 8: 515–21.
301. Serot JM, Béné MC, Faure GC. Comparative immunohistochemical characteristics of human choroid plexus in vascular and Alzheimer's dementia. *Hum Pathol* 1994; 25: 1185–90.
302. Serot JM, Béné MC, Foliguet B, Faure GC. Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 105–8.
303. Serot JM, Foliguet B, Béné MC, Faure GC. Choroid plexus and ageing in rats: a morphometric and ultrastructural study. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 794–8.
304. Serot JM, Foliguet B, Béné MC, Faure GC. Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport* 1997; 8: 1995–8.
305. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994; 93: 2393–402.
306. Shearer GM. Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev* 1997; 94: 1–5.
307. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol* 2013a; 13: 206–18.
308. Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PloS Med* 2009; 6: e1000113.
309. Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, Kim KW, Klein E, Kalchenko V, Bendel P, Lira SA, Jung S, Schwartz M. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 2013; 38: 555–69.
310. Shechter R, Schwartz M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *J Pathol* 2013; 229: 332–46.

311. Shintaku M, Nitta T, Matsubayashi K, Okamoto S. Ossifying choroid plexus papilloma recurring with features of atypical papilloma. *Neuropathology* 2008; 28: 160–4.
312. Shirai Y. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap Med World* 1921; 1: 14.
313. Shuangshoti S, Netsky Mg: Human choroid plexus: morphologic and histochemical alterations with age. *Am J Anat* 1970; 128: 73-96.
314. Shuvaev VV, Laffont I, Serot JM, Fujii J, Taniguchi N, Siest G. Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 397–402.
315. Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis. *Lancet Neurol* 2003; 2: 506–11.
316. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 2006; 49: 489–502.
317. Singhrao SK, Neal JW, Rushmere NK, Morgan BP, Gasque P. Differential expression of individual complement regulators in the brain and choroid plexus. *Lab Invest* 1999; 79: 1247- 59.
318. Smith DE, Johanson CE, Keep RF. Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 1765-91.
319. Smith X, Schneider H, Köhler K, Liu H, Lu Y, Rudd CE. The chemokine CXCL12 generates costimulatory signals in T cells to enhance phosphorylation and clustering of the adaptor protein SLP-76. *Sci Signal* 2013; 6: ra65.
320. Smith ZA, Moftakhar P, Malkasian D, Xiong Z, Vinters HV, Lazareff JA. Choroid plexus hyperplasia: surgical treatment and immunohistochemical results. Case report. *J Neurosurg* 2007; 107, 255–62.
321. Somel M, Khaitovich P, Bahn S, Paabo S, Lachmann M. Gene expression becomes heterogenous with age. *Curr Biol* 2006; 16: R359-60.
322. Sowell ER, Thompson PM, Toga AW. Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist* 2004; 10: 372-92.
323. Speake T, Whitwell C, Kajita H, Majid A, Brown PD. Mechanism of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 49– 59.
324. Spector R, Johanson CE. The nexus of vitamin homeostasis and DNA synthesis and modification in mammalian brain. *Mol Brain* 2014; 7: 3.
325. Spector R, Johanson CE. Vectorial ligand transport through mammalian choroid plexus. *Pharm Res* 2010; 27: 2054–62.
326. Spector R, Keep RF, Robert Snodgrass S, Smith QR, Johanson CE. A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Exp Neurol* 2015; 267: 78-86.
327. Spector R. Nature and consequences of mammalian brain and CSF efflux transporters: four decades of progress. *J Neurochem* 2010; 112: 13–23.
328. Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, Kleppe L, Veinot J, Edwards WD, Johnson CM, Fitzpatrick LA. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate

- mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest*. 1997; 99: 996-1009.
329. Steffen BJ, Breier G, Butcher EC, Schulz M, Engelhardt B. ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am J Pathol* 1996; 148: 1819–38.
330. Stevenson NJ, Addley MR, Ryan EJ, Boyd CR, Carroll HP, Paunović V, Bursill CA, Miller HC, Channon KM, McClurg AE, Armstrong MA, Coulter WA, Greaves DR, Johnston JA. CCL11 blocks IL-4 and GM-CSF signaling in hematopoietic cells and hinders dendritic cell differentiation via suppressor of cytokine signaling expression. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 289–97.
331. Stopa EG, Berzin TM, Sunyoung K, Song P, Kuo-LeBlanc V, Rodrigues-Wolf M, Baird A, Johanson CE, Human choroid plexus growth factors: what are the implications for CSF dynamics in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2000; 167: 40–7.
332. Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 561-74.
333. Sturrock RR. An ultrastructural study of intraventricular macrophages in the brains of aged mice. *Anat Anz* 1988; 165: 283-90.
334. Subraman V, Thiagarajan M, Malathi N, Rajan ST. Osteopontin – revisited. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: ZE10-3
335. Suzuki S, Katsumata T, Ura R, Fujita T, Niizima M, Suzuki H. Über die Nomina Anatomica Nova. *Folia Anatomica Japonica* 1936; 14: 507-536.
336. Swiderski RE, Agassandian K, Ross JL, Bugge K, Cassell MD, Yeaman C. Structural defects in cilia of the choroid plexus, subfornical organ and ventricular ependyma are associated with ventriculomegaly. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9: 22.
337. Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Gandy JR, Keefe TH, Zink BJ, Gherzi-Egea JF, Chodobski A. Posttraumatic invasion of monocytes across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 93–104.
338. Tang C, Chen T, Kapadnis S, Hodgdon H, Tao Y, Chen X, Wen M, Costa D, Murphy D, Nolan S, Flood DG, Welty DF, Koenig G. Neuropharmacokinetics of two investigational compounds in rats: divergent temporal profiles in the brain and cerebrospinal fluid. *Biochem Pharmacol* 2014; 91: 543–51.
339. Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Aβ peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 2004; 43: 605–8.
340. Tavani F, Zimmerman RA, Clancy RR, Licht DJ, Mahle WT. Incidental intracranial hemorrhage after uncomplicated birth: MRI before and after neonatal heart surgery. *Neuroradiology* 2003; 45, 253–8.
341. Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, Grasser WA, Thompson DD, Nishimoto SK. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology* 1994; 135: 929–37.
342. Timiras PS, editor. *Physiological basis of aging and geriatrics*. Informa Healthcare, 4th edition. London: 2007.
343. Tong Y, Merino D, Nimmervoll B, Gupta K, Wang YD, Finkelstein D, Dalton J, Ellison DW, Ma X, Zhang J, Malkin D, Gilbertson RJ. Cross-species genomics identifies TAF12,

- NFYC, and RAD54L as choroid plexus carcinoma oncogenes. *Cancer Cell* 2015; 27: 712–27.
344. Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekely CA, Tan J, Duman RS, Flavell RA. Blocking TGF-beta-Smad 2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med* 2008; 14: 681–687.
345. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 2011; 31: 16064–9.
346. Triggiani V, Guastamacchia E, Licchelli B, Tafaro E. Microcalcifications and psammoma bodies in thyroid tumors. *Thyroid* 2008; 18: 1017-8.
347. Tripathi BJ, Tripathi RC. Vacuolar transcellular channels as a drainage pathway for cerebrospinal fluid. *J Physiol* 1974; 239: 195–206.
348. Trollor JN, Valenzuela MJ. Brain ageing in the new millennium. *Aust N Z J Psychiatry* 2001; 35: 788-805.
349. Tsai WC, Lee HS, Lin CK, Chen A, Nieh S, Ma HI. The association of osteopontin and LMX1A expression with World Health Organization grade in meningiomas and gliomas. *Histopathology* 2012; 61: 844–56.
350. Tsuchida T, Matsumoto M, Shirayama Y, Kasai H, Kawamoto K. Observation of psammoma bodies in cultural meningiomas: analysis of three-dimensional structure using scanning and transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 1996; 20: 241–7.
351. Tsurumoto T, Zhu D, Sommer AP. Identification of nanobacteria in human arthritic synovial fluid by method validated in human blood and urine using 200 nm model nanoparticles. *Environ Sci Technol*. 2008; 42: 3324–8.
352. Tubuchi K, Kawakami Y, Nishimoto A. Immunohistochemical demonstration of IgG in meningioma. *Acta Neurochir (Wien)* 1981; 55: 201–11.
353. Tunio GM, Hirota S, Nomura S, Kitamura Y. Possible relation of osteopontin to development of psammoma bodies in human papillary thyroid cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 1087–1090.
354. Turtzo LC, Lescher J, Janes L, Dean DD, Budde MD, Frank JA. Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 82.
355. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. 2003 Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 489–94
356. Uma, Patted S, Handigund RS. Endometrial osseous metaplasia: Clinicopathological study of a case and literature review. *J Hum Reprod Sci* 2010; 3: 102-4.
357. Underwood JCE. *General and Systematic Pathology*, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2004. Pp. 266-69.
358. van de Loo PG, Soute BA, van Haarlem LJ, Vermeer C. The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 113–9.
359. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and Disease* 2010; 1: 147-57

360. Van Mieghem IM, Gryspeerdt S, Baekelandt M, van Holsbeeck B, Lefere P, Haspeslagh M, et al. Papillary serous adenocarcinoma of the endometrium: CTpathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 1534–6.
361. Varga Z, Vajtai I, Aguzzi A. The standard isoform of CD44 is preferentially expressed in atypical papillomas and carcinomas of the choroid plexus. *Pathol Res Pract.* 1996; 192: 1225-31.
362. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Despres S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; 477: 90–4.
363. Villeda SA, Wyss-Coray T (2013) The circulatory systemic environment as a modulator of neurogenesis and brain aging. *Autoimmun Rev* 12: 674 – 677
364. Virtanen I, Lehtonen E, Wartiovaara J. Structure of psammoma bodies of a meningioma in scanning electron microscopy. *Cancer* 1976; 38: 824–9.
365. Vivers S, Dransfield I, Hart SP. Role of macrophage CD44 in disposal of inflammatory cell corpses. *Clin Sci* 2002; 103: 441–9.
366. Vivers S, Heasman SJ, Hart SP, Dransfield I. Divalent cation-independent augmentation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by CD44 antibody. *Clin Exp Immunol.* 2004; 138: 447–52.
367. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 1999; 84: 166-78.
368. Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Cwyfan-Hughes S, Holly JM, Logan A. Distinct site of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBPs) in the mediation of IGF-II activity, *Endocrinology* 1999; 140: 520–32.
369. Wang HH, Wang XW, Tang CE. Osteopontin expression in nasopharyngeal carcinoma: its relevance to the clinical stage of the disease. *J Cancer Res Ther* 2011; 7; 138–42.
370. Wang JW, Tang QY, Ruan HJ, Cai W. Relation between serum osteocalcin levels and body composition in obese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58: 729–32.
371. Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S. Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 752–61.
372. Weinert BT, Timiras PS. Physiology of aging. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1706-16.
373. Wen GY, Wisniewski HM, Kascsak RJ. Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: a quantitative study. *Brain Res* 1999; 832: 40–6.
374. Whalley LJ, Deary IJ, Appleton CL, Starr JM. Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 369–82.
375. Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the bloodcerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 2000; 105: 279–85.

376. Will C, Fromm M, Müller D. Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int* 2008; 28: 577–84.
377. Willems BA, Vermeer C, Reutelingsperger CP, Schurgers LJ. The realm of vitamin K dependent proteins: shifting from coagulation toward calcification. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 1620–35.
378. Williams JL, Holman DW, Klein RS. Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 154.
379. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. (eds). *Gray's anatomy*, 37th edn. London: Churchill Livingstone, 1989.
380. Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 75–88.
381. Worcester EM, Beshensky AM. Osteopontin inhibits nucleation of calcium oxalate crystals. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 760: 375-7.
382. Wrede B, Liu P, Wolff JE. Chemotherapy improves the survival of patients with choroid plexus carcinoma: a meta-analysis of individual cases with choroid plexus tumors. *J Neurooncol* 2007; 85: 345–51.
383. Wu G, Guo JJ, Ma ZY, Wang J, Zhou ZW, Wang Y. Correlation between calcification and bone sialoprotein and osteopontin in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 2010-7.
384. Yamashima T, Kida S, Kubota T, Yamamoto S. The origin of psammoma bodies in human arachnoid villi. *Acta Neuropathol* 1986; 71: 19–25.
385. Yamate J, Ishimine S, Izawa T, Kumagai D and Kuwamura M. Macrophage populations and expressions of regulatory proinflammatory factors in the rat meninx under lipopolysaccharide treatment in vivo and in vitro. *Histol Histopathol* 2009; 24: 13-24.
386. Yildirim Erdoğan N, Hüten ON, Bahadır F, Sander E. Diffuse and psammomatous calcification in intestinal type gastric carcinoma: report of two cases with literature review. *Turk J Gastroenterol.* 2011; 22: 414-8.
387. Yin F, Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial energy metabolism and redox signaling in brain aging and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 353-71.
388. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 8156-60.
389. Yuen CY, Wong SL, Lau CW, Tsang SY, Xu A, Zhu Z, Ng CF, Yao X, Kong SK, Lee HK, Huang Y. From skeleton to cytoskeleton: osteocalcin transforms vascular fibroblasts to myofibroblasts via angiotensin II and Toll-like receptor 4. *Circ Res* 2012; 111: e55–66.
390. Zheng W. Choroid plexus and metal toxicity, in: L.W. Chang (Ed.), *Toxicology of Metals*, CRC Press, Boca Raton, 1996; pp. 609–626.
391. Zhou B, Li H, Xu L, Zang W, Wu S, Sun H. Osteocalcin reverses endoplasmic reticulum stress and improves impaired insulin sensitivity secondary to diet-induced obesity through nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Endocrinology* 2013; 154: 1055–68.
392. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 2006; 9: 268–75.
393. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 2016; 82: 42-9.



## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Владимир Живковић је рођен 30. марта 1973. године у Нишу, где је са одличним успехом завршио основну и средњу школу. На Медицинском факултету у Нишу, на студијама медицине, дипломирао је 2003. године са просечном оценом 9,61. У току студија обављао је послеове демонстратора на предмету Анатомија I.

На Медицинском факултету у Нишу, 2004. године, др Владимир Живковић је засновао радни однос као асистент приправник на предметима Анатомија I и II. Исте године уписао је последипломске студије, 2010. године је одбранио магистарску тезу под насловом „Акумулација липофусцинског пигмента у кори великог и малог мозга човека“. У звање асистента за ужу научну област Анатомија, изабран је 2011. године.

Владимир Живковић је аутор и ко-аутор преко 20 научних радова, од којих је 11 објављено у часописима на SCI листи.

Члан је Српског анатомског друшва и Секције за клиничку анатомију при Српском лекарском друштву.

Активно се служи енглеским језиком.



## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**МОРФОМЕТРИЈСКА И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА  
УДРУЖЕНОСТИ СТРУКТУРНИХ ПРОМЕНА СА ДИСТРИБУЦИЈОМ  
ПСАМОМА ТЕЛАШАЦА У ХОРОИДНИМ ПЛЕКСУСИМА МОЖДАНИХ  
КОМОРА ТОКОМ СТАРЕЊА ЧОВЕКА**

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, 10.06.2016 .

Потпис аутора дисертације:

  
Владимир С. Живковић



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

Наслов дисертације:

**МОРФОМЕТРИЈСКА И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА  
УДРУЖЕНОСТИ СТРУКТУРНИХ ПРОМЕНА СА ДИСТРИБУЦИЈОМ  
ПСАМОМА ТЕЛАШАЦА У ХОРОИДНИМ ПЛЕКСУСИМА МОЖДАНИХ  
КОМОРА ТОКОМ СТАРЕЊА ЧОВЕКА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 10. 06. 2016.

Потпис аутора дисертације:

  
Владимир С. Живковић



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

### **МОРФОМЕТРИЈСКА И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА УДРУЖЕНОСТИ СТРУКТУРНИХ ПРОМЕНА СА ДИСТРИБУЦИЈОМ ПСАМОМА ТЕЛАШАЦА У ХОРОИДНИМ ПЛЕКСУСИМА МОЖДАНИХ КОМОРА ТОКОМ СТАРЕЊА ЧОВЕКА**

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)

У Нишу, 10.06.2016.

Потпис аутора дисертације:

  
Владимир С. Живковић