

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

mr Predrag R. Nedeljković

**EFEKAT HIPERVITAMINSKE TERAPIJE  
VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA  
REGENERACIJU MOTORNE FUNKCIJE  
PERIFERNOG NERVA NA MODELU  
POVREDE FEMORALNOG NERVA  
PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

MSc Predrag R. Nedeljković

**THE EFFECT OF VITAMIN B  
COMPLEX THERAPY ON THE  
REGENERATION OF MOTOR FUNCTION  
OF THE PERIPHERAL NERVE IN RAT  
FEMORAL NERVE INJURY MODEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR:

---

Dr Marko Bumbaširević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Lukas Rasulić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

Dr Zoran Baščarević, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

Dr Dragana Vučević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru saradnje više institucija uključujući Vojnomedicinsku akademiju, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Histolab laboratoriji i Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Najveći deo istraživanja za ovu doktorsku tezu je urađen na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u okviru naučnoistraživačkih projekata Vojnomedicinske akademije broj MFVMA/4/13-15 i MFVMA/10/16-18 čiji je rukovodilac prof. dr Dragana Vučević.

U Histolab laboratoriji su uslužno pripremani preparati za histomorfološku i imunohistohemijsku analizu.

Histomorfološka istraživanja nerva i mišića su urađena na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u laboratoriji prof. dr Aleksandre Korać.

Imunohistohemijska istraživanja su urađena na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj III41014 kojim rukovodi naučni savetnik dr Sanja Peković.

## ZAHVALNICA

Zahvaljujem se:

Prof. Marku Bumbašireviću, mom mentoru, na zalaganju, posvećenosti i podršci koje je obeležilo naš zajednički rad.

Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije na kome je urađen eksperimentalni deo istraživanja, kao i celokupnom osoblju Instituta, posebno prof. dr Zvonku Magiću i prof. dr Dragani Vučević, doc. dr Biljani Drašković-Pavlović, dr sc vet. Milijani Vasiljevskoj, molekularnom biologu Dragani Zmijanjac, Dr Milanu Markoviću, kao i tehničarima Svetlani Franeti i Draganu Todoroviću.

Naučnom saradniku dr Sanji Peković sa Instituta za biološka istraživanja.

Profesorki dr Aleksandri Korać i docentkinji dr Sanji Dacić sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mojim roditeljima na nesebičnoj investiciji u moje obrazovanje.

Mojoj Biljani na podršci i pomoći koju mi je pružila tokom izrade ove teze.

Na kraju, zahvaljujem se svima koji su pomogli da se ovaj rad završi.

## REZIME

Efekat hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na regeneraciju motorne funkcije perifernog nerva na modelu povrede femoralnog nerva pacova

**Uvod:** Povrede perifernih nerava predstavljaju problem velikih razmera u savremenom svetu. Posledice po radnu i životnu aktivnost su velike usled ograničenih mogućnosti za regeneraciju, pogotovo motorne funkcije. Različiti terapijski pristupi su pokušali da poboljšaju rezultate motorne regeneracije. Značajan broj studija je pokazao povoljan efekat različitih vitamina B kompleksa na regeneraciju perifernog nerva (Liao i sar., 2010 i 2013; Fujii i sar., 1995; Talebi i sar., 2013; Turan i sar., 2014). U navedenim istraživanjima su korišćeni različiti eksperimentalni animalni modeli (Irintchev, 2011; Nichols i sar., 2005; Witehead i sar., 2005) kao i *in vitro* studije. U ovom radu je ispitivan uticaj hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na regeneraciju motorne funkcije femoralnog nerva pacova. Dodatno je ispitivan i efekat povrede i primenjene terapije na peritonealne makrofage.

**Ciljevi:** (I) Ispitati ćelijske mehanizme u regeneraciji i oporavku perifernog nerva nakon povrede i rekonstrukcije motorne grane *n. femoralis*-a; (II) Ispitati uticaj hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na električnu aktivnost, atrofiju i funkciju ciljnog mišića; (III) Ispitati uticaj hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara u području povređenog nerva i proces neuroreparacije praćen ekspresijom specifičnog markera izrastanja aksona (GAP 43); (IV) Ispitati uticaj hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo satelitskih ćelija tokom oporavka funkcije mišića praćen ekspresijom specifičnog markera (Pax7); (V) Ispitati uticaj povrede motorne grane *n. femoralis*-a i primenjene hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na funkciju peritonealnih makrofaga uključujući metaboličku vijabilnost, sposobnost fagocitoze, adhezije kao i produkcije reaktivnih oblika kiseonika, azot oksida (NO) i citokina.

**Materijal i metode:** U eksperimentu je korišćeno 115 adultnih mužjaka Albino Oxford pacova težine od 200 do 350 grama. Životinje su podeljene na eksperimentalnu i kontrolnu grupu. Životinjama eksperimentalne grupe, "operisanim" životinjama, je izvršena unilateralna transekcija motorne grane femoralnog nerva, koja je nakon toga

rekonstruisana tehnikom termino-terminalne anastomoze koristeći hirurški konac 9-0 (Ethicon Inc, Norderstedt, Germany). Životinje kontrolne grupe, “lažno operisane” životinje, prošle su istu eksperimentalnu proceduru, ali im nije izvršena transekcija nerva. Životinje su žrtvovane prvog, trećeg, sedmog, 14., 21., 30., 60., 90. i 120. dana nakon intervencije. Sve životinje korišćene u eksperimentu su podvrgnute istom setu analiza. Pre žrtvovanja, za procenu oporavka motorne funkcije korišćen je test ponašanja. Izmerena im je telesna masa, vršena je elektromiografija (EMG) radi procene oporavka mišića kvadricepsa. Potom su izolovani femoralni nerv (operisani, rekonstruisani *n. femoralis*, kao i kontralateralni *n. femoralis*) i mišić kvadriceps (*m. quadriceps* inervisan operisanim nervom, kao i *m. quadriceps* inervisan kontralateralnim, intaktnim nervom). Masa mišića kvadricepsa je takođe izmerena. Nakon toga, izolovani su i makrofagi, metodom peritonealne lavaže, a potom su životinje žrtvovane. Izolovani mišići i nervi su dalje korišćeni za histomorfološku analizu, dok su peritonealni makrofagi (PMF) podvrgnuti testovima za određivanje njihove vijabilnosti, sposobnosti fagocitoze, adhezije, produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i NO.

**Rezultati:** Kod obe grupe životinja došlo je do značajnog povećanja FBA (engl. foot base angle) neposredno nakon intervencije. Tokom perioda posmatranja, vrednosti ugla su se smanjivale, tj. približavale preoperativnim vrednostima. Značajnije smanjenje vrednosti je primećeno u grupi životinja tretiranih vitaminima B kompleksa. Vrednosti akcionih potencijala merenih EMG-om kod obe grupe životinja pokazuju značajan pad u periodu neposredno nakon intervencije uz postepen oporavak tokom perioda praćenja. Značajno veće vrednosti EMG su uočene kod grupe tretiranih životinja. Merenjem mišićne mase *m. quadricepsa* je konstatovan manji stepen atrofije u grupi životinja tretiranih vitaminima B kompleksa. Histološkim ispitivanjem određivana je gustina ćelijskih jedara nerva kao i mišića kvadricepsa. Femoralni nerv tretiranih životinja je pokazao manji stepen gustine ćelijskih jedara nakon povrede u odnosu na nerv kontrolnih, netretiranih životinja. Takođe, uočena je smanjena gustina ćelijskih jedara denervisanog mišića kvadricepsa u grupi životinja tretiranih vitaminima B kompleksa. Terapija vitaminima B kompleksa dovodi do smanjene degradacije mijelina, smanjene dediferencijacije Švanovih ćelija, poboljšanog izrastanja aksona distalno od mesta povrede, kao i smanjene proliferacije satelitskih ćelija u sklopu smanjenog reaktivnog

miogenog odgovora. PMF izolovani iz operisanih životinja ispoljavaju smanjenu metaboličku aktivnost, sposobnost adhezije, proizvodnju reaktivnih oblika kiseonika, NO, TNF- $\alpha$  i IL-10 u poređenju sa PMF izolovanim iz lažno operisanih životinja. PMF izolovani iz operisanih i tretiranih životinja imaju veću sposobnost odgovora na dodatni stimulus *in vitro* u poređenju sa PMF izolovanih iz operisanih životinja.

**Zaključak:** Rezultati ove doktorske disertacije potkrepljuju pretpostavku da primena vitamina B kompleksa u visokim dozama neposredno postoperativno dovodi do smanjenja degradacije mijelina, smanjene dediferencijacije Švanovih ćelija, poboljšanog izrastanja aksona, smanjene celularnosti povređenog nerva i njime inervisanog mišića što dovodi do boljeg oporavka motorne funkcije perifernog nerva praćeno smanjenjem mišićne atrofije, poboljšanog oporavka EMG vrednosti i funkcionalnog statusa. Povreda perifernog nerva utiče na funkcionalne karakteristike PMF u smislu smanjene vijabilnosti, sposobnosti fagocitoze i adhezije, produkcije NO, ROS i citokina (IL-10 i TNF- $\alpha$ ). Primena terapije vitaminima B kompleksa dovodi do oporavka poremećenih funkcija peritonealnih makrofaga indukovanih povredom perifernog nerva.

**Ključne reči:** periferni nerv, motorna regeneracija, vitamini B kompleksa, peritonealni makrofagi

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Hirurgija perifernih nerava

UDK BROJ:



## ABSTRACT

Effect of vitamin B complex therapy on the regeneration of motor function of the peripheral nerve in rat femoral nerve injury model

**Objective:** Injuries of the peripheral nerves represent a high scale problem in modern world. They lead to significant consequences considering working ability and quality of life due to restricted recovery, especially of motor function. Different therapeutical approaches were used in order to improve motor recovery. Significant number of studies showed beneficial effect of different vitamins of B complex on motor regeneration (Liao, et al. 2010 and 2013; Fujii, et al., 1995; Talebi, et al., 2013; Turan, et al., 2014). Different experimental animal models were used in these researches (Irintchev, 2011; Nichols, et al., 2005; Witehead, et al., 2005) as well as *in vitro* studies. Macrophages, abundant and phenotypically diverse immune cell populations, play an important role during peripheral nerves regeneration . In this study we investigated effect of vitamin B complex therapy on regeneration of motor function of the peripheral nerve and characteristics of peritoneal macrophages (PMF) in rat femoral nerve injury model.

**Aims:** (I) Investigate cell mechanisms involved in regeneration and recovery after injury and reconstruction of motor branch of femoral nerve; (II) Investigate effect of vitamin B complex therapy on electrical activity, atrophy and function of target muscle; (III) Investigate effect of vitamin B complex therapy on nuclear density in area of injured nerve and process of neuroreparation followed by expression of axon growth specific marker (Growth associated protein, GAP 43); (IV) Investigate effect of vitamin B complex therapy on presence of satellite cells during recovery phase of the muscle followed by expression of the specific marker (Paired box protein, Pax 7); (V) Investigate influence of femoral nerve motor branch injury and administered vitamin B complex therapy on function of PMF including metabolic viability, phagocytosis and adhesion abilities, as well as production of nitrogen oxide (NO), cytokines and reactive oxygen species (ROS).

**Methodology:** Experimental research included 115 male Albino Oxford rats weighing between 200 and 350 grams. The animals were divided into experimental and

control groups. Unilateral transection of motor branch of femoral nerve was performed in group of experimental animals, after which immediate reconstruction was done by end-to-end anastomosis using 9-0 suture (Ethicon Inc, Norderstedt, Germany). Group of control animals underwent the same experimental procedure, but without nerve transection. Animals were sacrificed one, three, seven, 14, 21, 30, 60, 90 and 120 days after injury. The same set of analysis was applied to all animals used in experiment. Behavioral test was used before sacrifice for assesment of motor function recovery. Animal's body mass was measured and electromyography (EMG) was performed to asses recovery of quadriceps muscle. Femoral nerves (operated, reconstructed, as well as contralateral, intact) and quadriceps muscles (inervated by injured and reconstructed nerve and contralateral, inervated by intact nerve) were isolated. Quadriceps mass was also measured. Using method of peritoneal lavage, macrophages were isolated and animals were sacrificed. Isolated muscles and nerves were further used for histomorfological analysis while peritoneal macrophages (PMF) were tested for their viablitiy, fagocytosis, adhesion, and capabillity of producing reactive oxygen species (ROS) and nitrogen monoxide (NO) .

**Results:** Significant increase of FBA (Foot-base angle) was noticed in both group of animals immediately after injury. Values of the angle decreased during observation period and approached preoperative counts, respectively. More significant decrease was noticed in group of animals that were treated with vitamin B complex. Values of compound action muscle potentials, measured by EMG, showed significant decrease in counts during postinjury period for both groups of animals with gradual recovery during observation period. Treated animals showed significantly greater values. Minor degree of muscle atrophy was measured in group of animals treated with vitamin B complex. Histological studies were used to determine muscle and nerve nuclear density. Femoral nerve of treated animals showed minor degree of nuclear density when compared to nerve of control, nontreated animals. Likewise, reduced nuclear densitiy was noticed in denervated quadricps muscle in groups of animals treated with vitamin B complex. Vitamib B complex therapy resulted in decreased myelin degradation, decreased dedifferentiation of Schwann cells, improved axonal growth distal to the site of injury, as well as decreased proliferation of myosatelite cells in the reduced reactive miogenic response. PMF isolated from operated animals showed

decreased metabolic activity, decreased adhesion ability, decreased ROS, NO, TNF- $\alpha$  and IL-10 production compared to PMF isolated from sham animals. PMF isolated from operated and treated animals showed increased response ability to additional stimulus *in vitro* compared to PMF isolated from operated animals. **Conclusion:** Results of this doctoral dissertation corroborate assumption that vitamin B complex therapy applied in high doses immediately postoperatively leads to reduction of muscle atrophy, improved recovery of EMG parameters, reduction of nuclear density of injured nerve and appropriate skeletal muscle which all leads to improved recovery of motor function of peripheral nerve. Peripheral nerve injury affects functional characteristics of peritoneal macrophages in terms of reduced viability, phagocytosis, adhesion and production of nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) and cytokines (IL-10 and TNF- $\alpha$ ). Vitamin B complex therapy leads to recovery of disturbed functions of peritoneal macrophages induced by peripheral nerve injury.

**Key words:** peripheral nerve, motor regeneration, B complex vitamins, peritoneal macrophages

**RESEARCH AREA:** Medicine

**SPECIAL TOPICS:** Peripheral nerve surgery

UDC number:

## SKRAĆENICE

Ach – acetilholin

ACTH – adrenokortikotropni hormon

ATP – adenzin trifosfat

BCG – (fr. *Bacillus Calmette – Guérin*)

BDNF (engl. *brain derived nerve factor*) – nervni faktor poreklom iz mozga

CNS – centralni nervni sistem

CNTF (engl. *ciliary neurotrophic factor*) – cilijarni neurotrofni faktor

CoA – koenzim A

CRH (engl. *corticotropin-releasing hormone*) – kortikotropin oslobađajući hormon

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

ECM – ekstracelularni matriks

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – enzim imuno test

EMG – elektromiografija

EMNG – elektromioneurografija

ENG – elektroneurografija

FBA (engl. *foot-base angle*) – ugao između stopala i podloge

GAP 43 (engl. *growth associated protein*) – protein asociran sa rastom aksona

GDNF (engl. *glial cell-derived neurotrophic factor*)

HPA osa (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) – hipotalamo-hipofizno- adrenalna osa

IGF-1 (engl. *insulin-like growth factor*) – insulinu sličan faktor rasta

iNOS (engl. *inducibile nitric oxid synthetase*) – inducibilna azot oksid sintetaza

LIF (engl. *leukemia inhibitory factor*) – leukemija inhibitorni faktor

LOX – lipooksigenaza

LPMF (engl. *large peritoneal macrophages*) – veliki peritonealni makrofagi

LPS – lipopolisaharid

MAP (engl. *protein associated microtubules*) – proteini asocirani sa mikrotubulama

MAPK – mitogen aktivirajuća protein kinaza

MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) – monocitni hemoatraktantni protein 1

MF – makrofagi

MHC (engl. *major histocompatibility complex*) – glavni histokompatibilni kompleks

MNA – metilnikotinamid

NA – nikotinamid

NADPH – nikotinamid adenin dikuleotid fosfat

NGF (engl. *nerve growth factor*) – faktor rasta nerva

NK (engl. *natural killer*) – urođenoubilačke ćelije

NO – azot monoksid

NT – neurotrofin

OPN – osteopontin

PMF – peritonealni makrofagi

PNI (engl. *peripheral nerve injury*) – povreda perifernog nerva

PNS – periferni nervni sistem

RA (engl. *retinoic acid*) – retinoična kiselina

ROS (engl. *reactive oxygen species*) – reaktivni oblici kiseonika

SFMA (engl. *single-frame motion analysis*) – test analize pokreta

SPMF (engl. *small peritoneal macrophages*) – mali peritonealni makrofagi

TNF (engl. *tumor necrosis factor*) – faktor nekroze tumora

trk – tirozin kinaza

UCN – urokortin

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	0
1.1.	EPIDEMIOLOGIJA I INCIDENCA POVREDA PERIFERNOG NERVNOG SISTEMA 1	
1.2.	ANATOMIJA PERIFERNOG NERVA.....	2
1.3.	KOMPONENTE PERIFERNOG NERVNOG SISTEMA.....	3
1.3.1.	Švanove ćelije.....	3
1.3.2.	Elementi vezivnog tkiva .....	4
1.3.3.	Vaskularizacija .....	5
1.3.4.	Periferni nervni organi (ciljni ili „end“ organi) .....	6
1.4.	ETIOLOGIJA LEZIJA PERIFERNOG NERVA.....	9
1.5.	VALERIJANOVA DEGENERACIJA.....	10
1.5.1.	Procesi degeneracije, regeneracije i promene neurona nakon povrede.....	10
1.5.2.	Promene u Švanovim ćelijama nakon lezije nerva .....	12
1.5.3.	Biologija izduživanja aksona.....	14
1.5.4.	Faktori rasta .....	15
1.6.	INFLAMATORNI ODGOVOR NAKON POVREDE NERVA (SISTEMSKI STRES ODGOVOR) 18	
1.7.	DIJAGNOZA LEZIJE NERVA .....	19
1.8.	TERAPEUTSKI PRISTUPI U CILJU OPORAVKA NERVA NAKON POVREDE 23	
1.8.1.	Neoperativno lečenje .....	24
1.8.2.	Fizikalna terapija .....	24
1.8.3.	Operativno lečenje.....	25
1.8.4.	Faktori koji utiču na rezultate reparacije nerava.....	26
1.8.5.	Adjuvantna terapija (vitamini B kompleksa).....	28
1.9.	ANIMALNI MODELI POVREDE PERIFERNIH NERAVA.....	31
1.9.1.	Model povrede facijalnog nerva .....	31
1.9.2.	Model povrede išijadičnog nerva .....	32
1.9.3.	Model povrede femoralnog nerva.....	32
1.10.	PERITONEALNI MAKROFAGI .....	33
1.10.1.	Subsetovi peritonealnih makrofaga .....	34
1.10.2.	Regulacija peritonealnih makrofaga.....	36
1.10.3.	Efekat vitamina B kompleksa na peritonealne makrofage .....	40
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	41
3.	MATERIJAL I METODE.....	43
3.1.	MATERIJAL.....	44
3.1.1.	Eksperimentalne životinje .....	44

3.1.2.	Reagensi i rastvori .....	44
3.1.3.	Antitela .....	47
3.2.	EKSPERIMENTALNI MODEL POVREDE MOTORNE GRANE FEMORALNOG NERVA PACOVA .....	48
3.2.1.	Eksperimentalne grupe i tretman životinja .....	49
3.3.	METODE .....	52
3.3.1.	Test ponašanja/hodanja .....	52
3.3.2.	Elektrofiziološka procena oporavka .....	52
3.3.3.	Procena atrofije mišića .....	53
3.3.4.	Priprema preparata za histološku i imunohistohemijsku analizu .....	53
3.4.	PERITONEALNI MAKROFAGI .....	55
3.4.1.	Izolacija peritonealnih makrofaga .....	56
3.4.2.	May-Grünwald Giemsa bojenje preparata .....	56
3.4.3.	Imunocitohemija .....	57
3.4.4.	Protočna citometrija .....	58
3.4.5.	Određivanje metaboličke aktivnosti .....	59
3.4.6.	Test fagocitoze .....	59
3.4.7.	Test adhezije za nećelijski matriks .....	60
3.4.8.	Test redukcije tetrazolijumske soli .....	60
3.4.9.	Određivanje produkcije azot oksida .....	61
3.4.10.	Određivanje produkcije citokina .....	61
3.5.	STATISTIČKA ANALIZA .....	62
4.	REZULTATI .....	63
4.1.	DINAMIKA OPORAVKA FEMORALNOG NERVA NAKON TRANSEKCIJE I TERMINO-TERMINALNE ANASTOMOZE .....	64
4.1.1.	Funkcionalni oporavak procenjivan testom hodanja nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka .....	64
4.1.2.	Atrofija mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka .....	66
4.1.3.	Elektromiografska aktivnost mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka .....	67
4.1.4.	Promena gustine ćelijskih jedara femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka .....	69
4.1.5.	Prisustvo Švanovih ćelija u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze tokom perioda oporavka .....	72
4.1.6.	Prisustvo mijelin baznog proteina u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze tokom perioda oporavka .....	75
4.1.7.	Izrastanje aksona u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze tokom perioda oporavka .....	77

4.1.8.	Gustina ćelijskih jedara mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka.....	79
4.1.9.	Prisustvo satelitskih ćelija u mišiću kvadricepsu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka.....	82
4.2.	EFEKAT TERAPIJE VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA OPORAVAK FEMORALNOG NERVA.....	85
4.2.1.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na funkcionalni oporavak procenjivan testom hodanja nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva	86
4.2.2.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na atrofiju mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva.....	88
4.2.3.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na elektromiografsku aktivnost mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva.....	89
4.2.4.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva .....	90
4.2.5.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo Švanovih ćelija u femoralnom nervu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze.....	92
4.2.6.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo mijelin baznog proteina u femoralnom nervu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze.....	93
4.2.7.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na izrastanje aksona u femoralnom nervu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze .....	96
4.2.8.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva.....	97
4.2.9.	Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo satelitskih ćelija u mišiću kvadricepsu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva.....	100
4.3.	EFEKAT POVREDE FEMORALNOG NERVA NA FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE PERITONEALNIH MAKROFAGA.....	102
4.3.1.	Karakterizacija ćelijskih populacija peritonealnog lavata nakon povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa .....	102
4.3.2.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije na fenotipske karakteristike peritonealnih makrofaga.....	106
4.3.3.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na <i>ex vivo</i> karakteristike peritonealnih makrofaga.....	106
4.3.4.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na metaboličku aktivnost peritonealnih makrofaga <i>in vitro</i> .....	110
4.3.5.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na fagocitoznu/pinocitoznu sposobnost peritonealnih makrofaga <i>in vitro</i> .....	111
4.3.6.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost adhezije peritonealnih makrofaga <i>in vitro</i> .....	112



4.3.7.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost produkcije reaktivnih oblika kiseonika od strane peritonealnih makrofaga <i>in vitro</i>	113
4.3.8.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost produkcije NO od strane peritonealnih makrofaga <i>in vitro</i>	114
4.3.9.	Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost produkcije TNF- $\alpha$ i IL-10 od strane peritonealnih makrofaga <i>in vitro</i>	115
5.	DISKUSIJA	118
5.1.	REGENERACIJA MOTORNE GRANE FEMORALNOG NERVA	120
5.2.	EFEKAT TERAPIJE VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA REGENERACIJU MOTORNE GRANE FEMORALNOG NERVA	124
5.3.	EFEKAT POVREDE FEMORALNOG NERVA I TERAPIJE VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA PERITONEALNE MAKROFAGE	130
6.	ZAKLJUČCI	135
7.	LITERATURA	138
8.	PRILOZI	159
8.1.	BIOGRAFIJA KANDIDATA	161
8.2.	IZJAVA O AUTORSTVU	162
8.3.	IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE	163
8.4.	IZJAVA O KORIŠĆENJU	164

# **1. UVOD**

## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA I INCIDENCA POVREDA PERIFERNOG NERVNOG SISTEMA

Povrede periferenih nerava predstavljaju problem velikih razmera sa kojim se susreću milioni ljudi širom sveta (Daly i sar., 2012). U razvijenim zemljama na 100 000 osoba, godišnje u proseku 20 (13-23) osoba pretrpi povredu perifernog nerva (*engl. peripheral nerve injury*, PNI) (Irintchev, 2011). Na području Evrope povrede periferenih nerava dostižu broj od 300 000 godišnje (Harding i sar., 2014). Broj povreda periferenih nerava je u stalnom porastu usled rasta stope saobraćajnih udesa, industrijskog traumatizma, kao i povreda na radu. Traume nerava rezultuju značajnim neurološkim deficitom i skoro uvek ostavljaju određeni procenat invaliditeta (Eser 2009; Andjelkovic i sar., 2010). Znatno češće se javljaju kod mladih osoba muškog pola u najproduktivnijem životnom dobu (Noble i sar., 1998; Adeyemi-Doro, 1988) te se stoga postavljaju veliki funkcionalni zahtevi i pacijenti očekuju povratak ne samo svakodnevnim životnim, već i radnim aktivnostima. Ove povrede uzrokuju značajno odsustvo sa posla usled dugotrajne rehabilitacije, a često i nemogućnost ponovnog povratka na isto radno mesto, što ima veliki socioekonomski značaj (Andjelković i sar., 2010; Schenker i sar., 2006).

Epidemiološki i etiološki faktori povreda perifernog nerva mogu da variraju u periodima mira i ratnih sukoba, kao i u skladu sa razvojnim nivoom populacija. Procenjeno je da u Evropskoj populaciji povrede periferenih nerava najčešće nastaju u domaćinstvu, radnom mestu i saobraćaju. Povrede periferenih nerava često nastaju u sklopu saobraćajnog traumatizma kao posledica preloma okolnih kostiju. Takođe, čest uzrok predstavljaju sekotine oštrim predmetima, zatim penetrantne povrede oštrim i tupim predmetima. Jatrogeni faktor ima veliki značaj, pogotovo u zemljama u razvoju (Eser i sar., 2009; Villarejo i Pascual, 1993), i može imati udeo od 17.4%. Značajan udeo imaju i povrede vatrenim oružjem (Kanada 7.4%, Turska 9.3%, Pakistan 83.3%) (Eser i sar., 2009; Noble i sar., 1998; Babar, 1993).

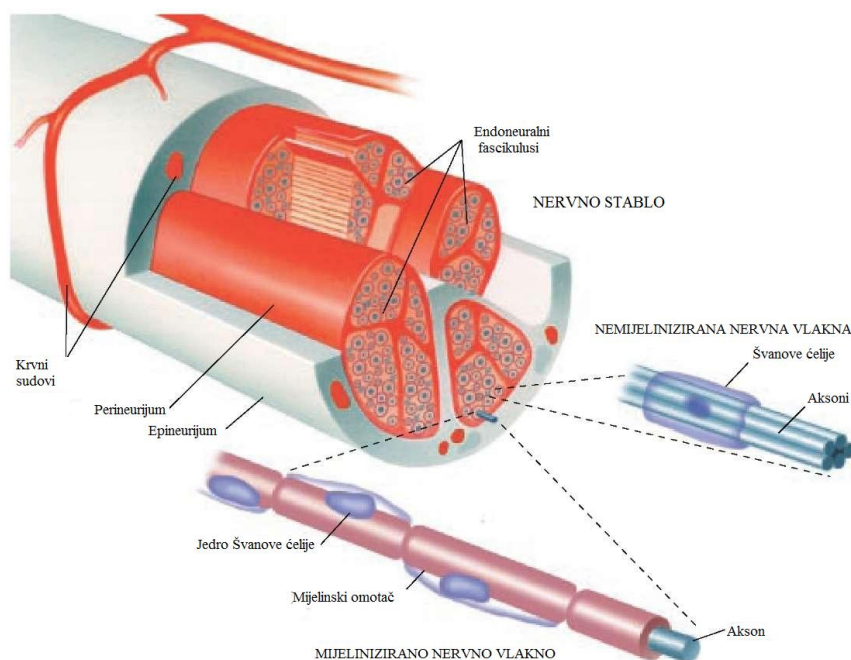
Procenjeno je da 2-3% ukupnog broja povreda čine povrede periferenih nerava (5% ukoliko se u obzir uzmu povrede pleksusa i korenova) (Noble i sar., 1998; Selecki i sar., 1982). Na gornjem ekstremitetu najčešće su povrede *n. radialis-a*, potom *n.*

*ulnaris-a* i *n. medianus-a* (Noble i sar., 1998; Adeyemi-Doro, 1988; Kouyoumdjian, 2006). Povrede perifernih nerava donjih ekstremiteta su manje uobičajene, pri čemu su najčešće povrede *n. ischiadicus-a*, zatim *n. peroneus-a* i retko *n. tibialis-a* i *n. femoralis-a*. Povrede perifernog nerva nastale u saobraćajnim nesrećama su često udružene sa traumom centralnog nervnog sistema, što otežava prepoznavanje lezija perifernog nerva (Andjelkovic i sar., 2010; Selecki i sar., 1982; Kouyoumdjian, 2006; Robinson, 2000).

## **1.2. ANATOMIJA PERIFERNOG NERVA**

Periferni nervni sistem je kompleksna struktura izgrađena od *neurona*, potpornog vezivnog tkiva, ćelijskih elemenata i ciljnih organa (tzv. „end“ organa) (slika 1). Osnovna funkcija perifernog nervnog sistema je primanje nadražaja iz okoline i njihov prenos do CNS-a, kao i slanje nadražaja iz CNS-a u okolinu čime se zapravo omogućava povezivanje periferije i centralnog nervnog sistemom putem aferentnih i eferentnih vlakana (Machinnon i Dellon, 1988). Neuronu međusobno komuniciraju putem mnogobrojnih nastavaka nazvanih *dendriti* (uglavnom su kratki), a šalju po jedan duži nastavak ka periferiji označen kao *akson*. Snopovi aksona izgrađuju spinalne korenove (prednje i zadnje) koji se spajaju distalno od senzornog ganglionu i formiraju jedinstven koren. Aferentna vlakna završavaju u perifernim senzornim receptorima a eferentna na neuromuskularnim spojnica (neuromuskularnim pločama) (Brandt i Mackinnon, 1997). Pojedinačna nervna vlakna (aksoni) sačinjavaju snopove (*fascikuluse*). Fascikulusi se grupišu u *grupe fascikulusa*, a nekoliko grupa fascikulusa formira periferni nerv.

Osim aksona, koji čine funkcionalni deo nerva, svaki periferni nerv sadrži određeni procenat vezivnog tkiva koje ima funkciju mehaničke potpore, ishrane, odbrambenu i reparativnu funkciju. Procenat vezivnog tkiva varira od nerva do nerva i od lokalizacije do lokalizacije i iznosi od 25% do čak 85%. Veći procenat primećen je na mestima gde nerv trpi pritisak, istezanje (npr. na nivou zglobova ili osteofibroznih kanala) ili kada nerv sadrži veći broj manjih fascikulusa. Vezivni elementi su odgovorni za tenzionu snagu svakog fascikulusa (Terzis i Smith, 1990).



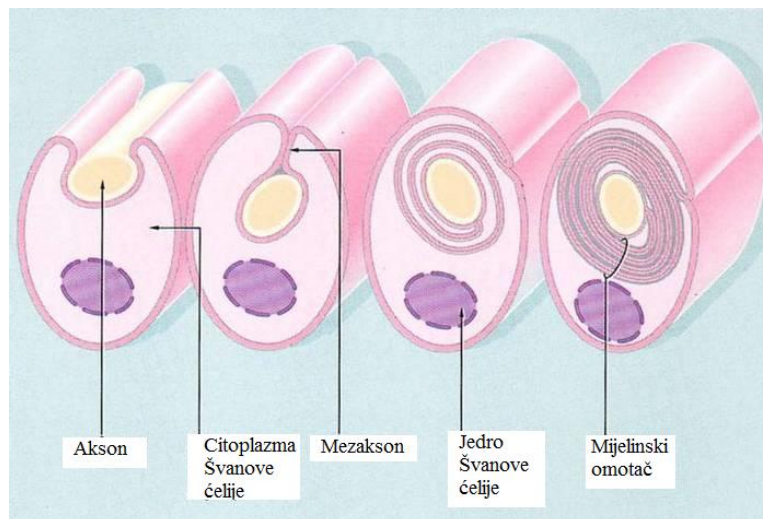
Slika 1. Anatomija perifernog nerva

## 1.3. KOMPONENTE PERIFERNOG NERVNOG SISTEMA

### 1.3.1. Švanove ćelije

Švanova (*Schwan*) ćelija predstavlja neuronalnu satelitsku ćeliju perifernog nervnog sistema i svi aksoni su omotani u različitom stepenu ovim ćelijama koje stvaraju *mijelin* (Slika 2). Embrionalno poreklo ovih ćelija je neuroektodermalno i one rastu u skladu sa rastom aksona. Odnos aksona i Švanovih ćelija je 1:1 za mijelizirane aksone. Kod nemijeliziranih aksona, grupa od 8-15 aksona omotana je jednom ćelijom, odnosno njenim duplikaturama. Pretpostavlja se da debljina i trofički uticaj aksona na Švanovu ćeliju igra ulogu u „odluci“ da li će neki akson biti mijeliniziran ili ne (deblji aksoni su mijelinizirani). *Mijelin* je proteofosfolipid u koji je u više slojeva uvijena membrana Švanove ćelije iz koje je eliminisana citoplazma. Debljina mijelinskog omotača je srazmerna debljini aksona. Motorni nervi imaju srazmerno deblji mijelinski omotač od senzitivnih. Mijelinski omotač aksona nije u kontinuitetu, već postoje prekidi u vidu *Ranvijerovih (Ranvier) čvorova (nodusa)*. Mijelinizirani akson je sposoban za depolarizaciju samo u nivou nodusa. Sprovođenje impulsa se odvija sekvencijalnom

depolarizacijom sukcesivnih nodusa bez depolarizacije internodalnog dela. Time se postiže brže sprovođenje impulsa duž nerva (Birch, 2005).



Slika 2. Švanova ćelija u perifernom nervu

### 1.3.2. Elementi vezivnog tkiva

Periferni nervi sadrže tri međusobno različite grupe vezivnih tkiva uključujući endoneurijum, perineurijum i epineurijum (slika 3). Ove vezivne ovojnice obezbeđuju raznolike mehaničke i fiziološke funkcije. Aksoni su, kao što je navedeno, povezani u skupine, tj. fascikuluse.

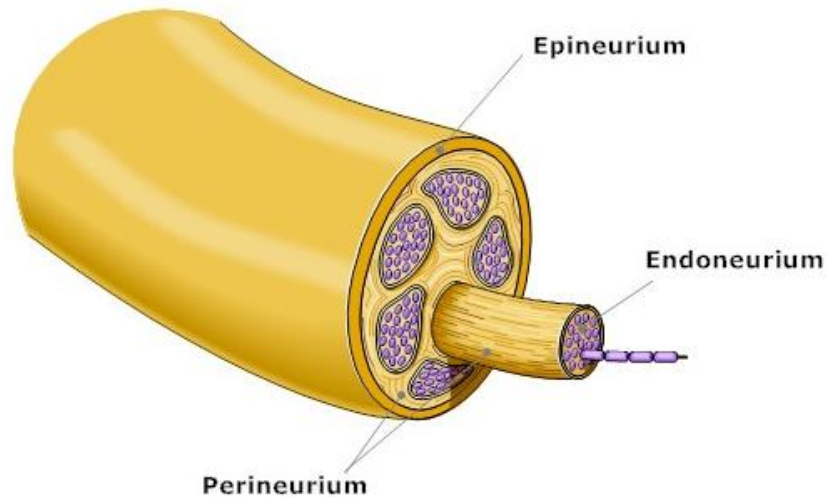
*Endoneurijum* predstavlja vezivno tkivo koje se nalazi unutar fascikulusa i čine ga mukopolisaharidna osnovna supstanca zajedno sa uzdužno orijentisanim kolagenim vlaknima i manjim brojem retikulinskih vlakana. Osnovna ćelija je fibroblast.

*Perineurijum* predstavlja vezivno tkivo oko grupa fascikulusa. Perineurijum se ponekada deli na unutrašnji, bogatiji celularnim elementima, i spoljašnji, bogatiji kolagenom.

*Epineurijum* je vezivo koje se nalazi između grupa fascikulusa (unutrašnji) i oko samog nerva (spoljašnji epineurijum). Spoljašnji slojevi epineurijuma su u kontinuitetu sa mezoneurijumom, dok su unutrašnji povezani sa perineurijumom. Takođe, u sastav epineurijuma ulaze i kolagen, fibroblasti, mast ćelije i masno tkivo.

S obzirom na tip arhitektonike, periferni nervi se mogu podeliti na:

1. Monofascikularne čini jedan veliki fascikulus,
2. Oligofascikularne čini nekoliko većih fascikulusa,
3. Polifascikularne čini veći broj fascikulusa različitih veličina, organizovanih ili neorganizovanih u grupe (Terzis i Smith, 1990).



Slika 3. Elementi vezivnog tkiva perifernog nerva

### 1.3.3. Vaskularizacija

Nervno tkivo je, kao metabolički visokoaktivno, veoma osetljivo na ishemiju, stoga je adekvatno vaskularizovano. Vaskularizaciju perifernog nerva obezbeđuju dva integrisana ali funkcionalno nezavisna sistema, *ekstrinzični i intrinzični*.

*Ekstrinzični sistem* je sačinjen od segmentalno orijentisanih krvnih sudova (mezoneurium) koji variraju u veličini i potiču od susednog većeg krvnog suda (arterije i vene). Dodatno, znatna količina krvi može poticati iz muskularnih perforatora ili periostalnih krvnih sudova. Kada ekstrinzični krvni sudovi dosegnu epineurijum, oni se granaju i snabdevaju intraneuralne pleksuse ascendentnim i descendentnim granama. Krvni sudovi su trotoozni i na taj način obezbeđuju “rezervu u dužini” tj. omogućavaju istežanje nerva u određenoj meri.

*Intrinzični sistem* počinje na mestu grananja ekstrinzičnog. Vaskularni pleksus u epineurijumu ima osobine visokoadaptibilnog sistema, sposobnog da preusmeri veliku

količinu volumena krvi u skladu sa metaboličkim zahtevima. Slično su organizovni krvni sudovi u perineurijumu. Endoneuralni krvni sudovi formiraju pleksus neposredno ispod perineurijuma i, u normalnim uslovima, funkcioniše samo deo mreže.

Ovakva longitudinalna organizacija vaskularne mreže perifernih nerava omogućava znatnu mobilizaciju nerva bez opasnosti od ishemije. Međutim, istežanje u iznosu od 8% dužine dovodi do poremećaja u venskoj drenaži (venska staza), dok istežanje u iznosu od 15% dovodi do prekida arterijske cirkulacije (ishemija) (Lawrence i Kashyap, 2000).

Što se tiče ultrastrukture krvnih sudova postoje određene razlike. Epi- i perineuralni krvni sudovi imaju nešto razmaknutije endotelne ćelije i to omogućava ekstravazaciju proteina. Kod endoneuralnih sudova to nije slučaj, ćelije tesno naležu jedna na drugu i ti krvni sudovi, zajedno sa perineurijumom, čine hematoneuralnu barijeru, sličnu hematoencefalnoj barijeri u CNS-u.

Intrafascikularna mreža je sačinjena od kapilara koji su većeg kalibra nego uobičajeni kapilari čime je omogućen veći intravaskularni volumen i kapacitet kao i u ostalim visokometabolički zahtevnim tkivima, npr. mišićima (Birch, 2005).

*Senzorni receptori* se prema Čončkovu (Chouchkov 1978) mogu svrstati u dve osnovne grupe, inkapsulirane i neinkapsulirane. U pogledu lokalizacije periferni senzorni receptori se dele i na receptore kože koja ne sadrži dlake (glatka koža), receptore kože koja sadrži dlake (dlakava koža) i mukokutane receptore

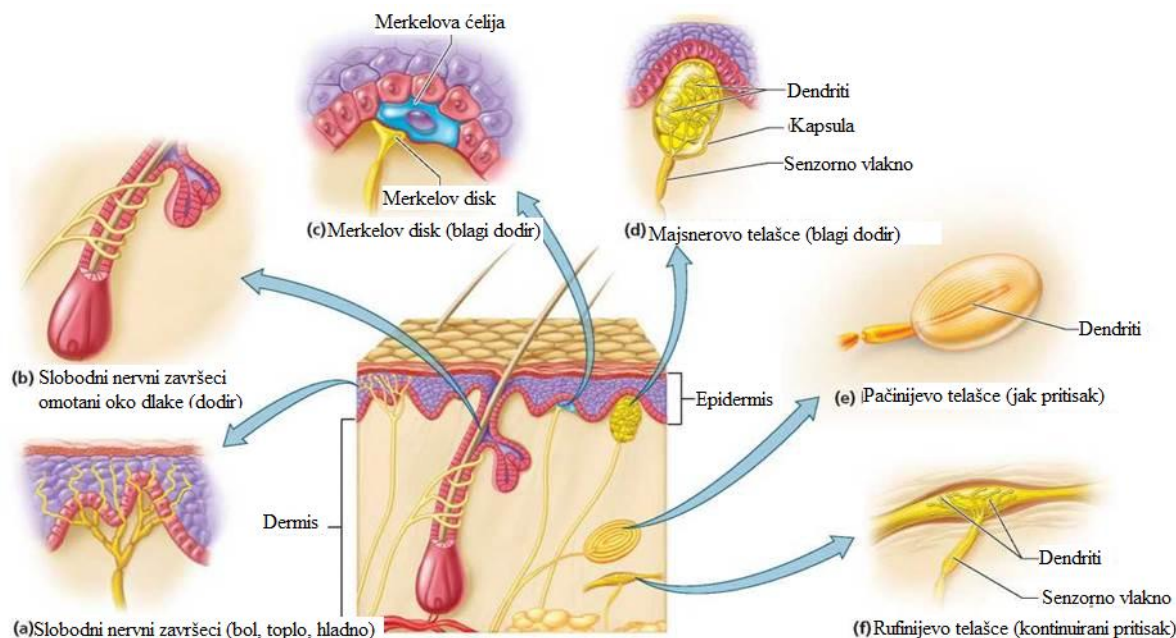
#### **1.3.4. Periferni nervni organi (ciljni ili „end“ organi)**

*Senzorni receptori* se prema Čončkovu (Chouchkov 1978) mogu svrstati u dve osnovne grupe, inkapsulirane i neinkapsulirane. U pogledu lokalizacije periferni senzorni receptori se dele i na receptore kože koja ne sadrži dlake (glatka koža), receptore kože koja sadrži dlake (dlakava koža) i mukokutane receptore.

1. Nedlakava (glatka) koža ljudi sadrži najgušću perifernu inervaciju. Periferni nervi se granaju ispod same površine kože i stvaraju subdermalne pleksuse iz kojih se daljim grananjem formiraju subpapilarni pleksusi. Ovi pleksusi sadrže mijelinizirana i nemijelinizirana vlakna (grupe A i C) i inervišu specifične ciljne organe a takođe završavaju i kao slobodni nervni završeci. Četiri vrste inkapsuliranih receptora se nalaze u ovom tipu kože:



brzoadaptirajuća Majsnerova-ova (*Meissner*) i Pačini-jeva (*Pacini*) telašca, kao i sporoadaptirajuća Merkel-ova (*Merkel*) i Rufinijeva (*Ruffini*) telašca (slika 4).



Slika 4. Sensorni receptori kože koja ne sadrži dlake

*Majsnerova telašca* se nalaze unutar dermalnih papila i odgovorni su za prijem niskofrekventnih vibracija i oset dinamičkog dodira. Pod konstantnim stimulusom oset se javlja samo na početku.

*Pačinijevo telašce* je vidljivo golim okom. Odgovorno je za prijem visokofrekventnih vibracija i dinamičkog dodira.

*Merkelovo telašce* se nalazi na epidermo-dermalnoj granici i spada u sporoadaptirajuće receptore.

*Rufinijevu telašce* predstavlja sporoadaptirajući mehanoreceptor koji reaguje na konstantat pritisak i pokazuje veoma mali stepen adaptacije.

2. Dlakava koža deli mnoge karakteristike sa kožom koja ne sadrži dlake.

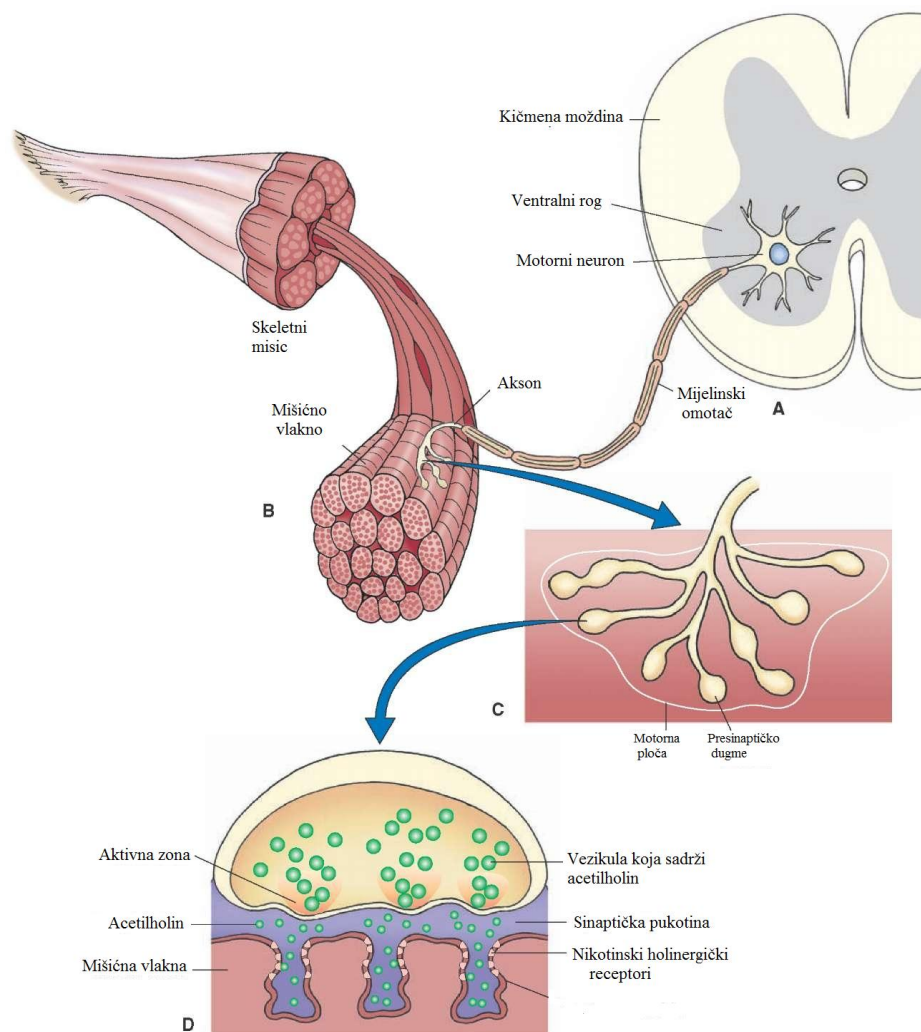
Pačinijeva, Merkelova i Rufinijeva telašca su identično lokalizovana, ali nedostaju Majsnerovi telašca. Dlaka sa svojim nervnim pleksusom takođe predstavlja ciljni organ.

3. Mukokutani receptori se nalaze u prelaznoj zoni između kože i mukoze koja

sadrži senzorni organ koji se ne nalazi u koži. Organ nije inkapsuliran i naziva se raznim imenima, najčešće *genital end bulb* (Lawrence i Kashyap, 2000).

### *Motorni ciljni ili „end“ organi*

Termin “motorna jedinica” je prvi put uveden od strane Šeringtona (Sherrington) 1929. godine (slika 5). Uopšteno, izgled motorne ploče, terminalne strukture eferentnog aksona je sledeći: mijelinizirani A $\alpha$  akson prilazi vlaknu koje će inervisati i formira divergentu nemijeliniziranih aksona koji se rasprostiru nad mišićnim vlaknom. Svaki akson je odvojen od samog mišićnog vlakna sinaptičkom pukotinom. Cela motorna ploča je pokrivena Švanovom ćelijom koja je izoluje od okolnog vezivnog tkiva. Svaki pojedinačni A $\alpha$  motorni akson inerviše od 10 do 100 pojedinačnih mišićnih vlakana (Birch, 2005).



Slika 5. Građa motorne ploče

## 1.4. ETIOLOGIJA LEZIJA PERIFERNOG NERVA

Uopšteno govoreći, periferni nervi mogu biti povređeni u sklopu zatvorenih ili otvorenih povreda. Otvorene povrede su češće, iako i zatvorene povrede zauzimaju značajan procenat. Po tipu povrede, mogu se razlikovati (Rosbery i sar., 2005):

1) *laceracije (transekcije)* - oko 30% povreda perifernih nerava otpada na ovu grupu. Delimične transekcije čine oko 15% povreda, dok je u ostalim slučajevima došlo do potpunog prekida kontinuiteta nerva.

2) *istezanja (trakcija) i kontuzije* - nerv je najčešće makroskopski u kontinuitetu, mada može doći i do potpunog prekida kontinuiteta.

3) *kompresija i ishemija* - kod kompresija lakšeg stepena dolazi do segmentne demijelinizacije, dok je kod težih kompresija moguća i Valerova degeneracija. Posledična je ishemija i fibroza.

4) *prostrelne povrede* - mogu biti posledica direktnog povređivanja nerva od strane projektila, kada dolazi do prekida kontinuiteta, ili, u većini slučajeva, očuvanja kontinuiteta sa različitim stepenom intraneuralnog oštećenja, kada projektil prolazi blizu nerva (blast povrede).

5) *električne, termičke i iradijacione povrede* - dovode do oštećenja nerava različitog stepena.

6) *injekcione povrede* - kombinovano dejstvo mehaničke povrede i hemijskog oštećenja zbog injiciranja neurotoksičnog agensa.

Na osnovu težine povrede, može se razlikovati nekoliko stepeni povrede perifernog nerva.

Sedon (Seddon, 1948) zaključuje da se mogu razlikovati tri stepena:

*Neurapraksija* predstavlja fiziološki blok sprovođenja gde je nerv anatomski i histološki normalan. Nastaje najčešće usled tupe traume, istezanjem, kompresijom i ishemijom. Oporavak je potpun i spontan.

*Aksonotmeza* podrazumeva prekid kontinuiteta aksona, bez oštećenja veziva. Oporavak je spontan ali dugotrajan, hirurška intervencija nije indikovana.

*Neurotmeza* je lezija aksona i vezivnog tkiva, kompletna ili inkompletna. Indikovana je hirurška intervencija s ciljem rekonstrukcije nerva.

S druge strane Sanderlend (Sunderland, 1968) daje nešto precizniju podelu lezija

na pet stepeni:

*I stepen* odgovara neurapraksiji po Sedonu

*II stepen* je oštećenje aksona bez lezije veziva

*III stepen* je oštećenje aksona i endoneurijuma

*IV stepen* je oštećenje aksona, endoneurijuma i perineurijuma

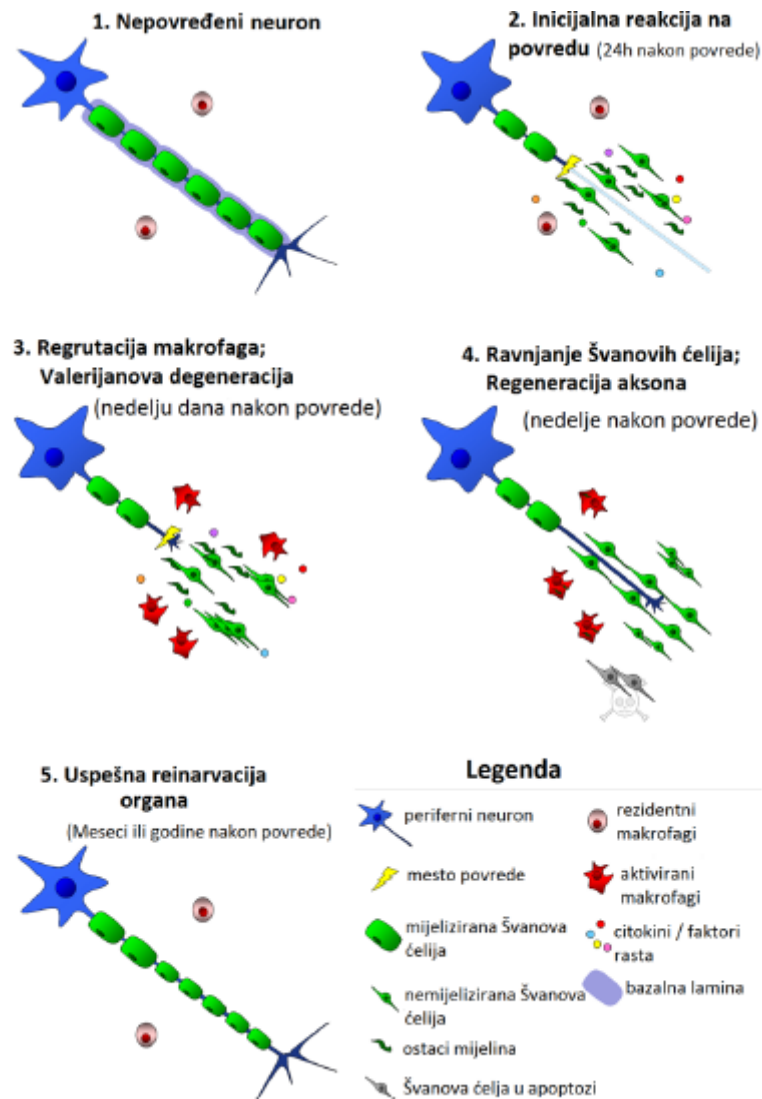
*V stepen* je kompletna transekcija nerva

## **1.5. VALERIJANOVA DEGENERACIJA**

### **1.5.1. Procesi degeneracije, regeneracije i promene neurona nakon povrede**

Nakon povrede nerva, proksimalni i distalni deo povređenog nerva podležu strukturnim i molekularnim promenama, kako bi se odigrali pripremni procesi neophodni za regeneraciju aksona. Proksimalni deo podleže odumiranju i degeneraciji do prvog Ranvijerovog čvora. Distalni deo pokidanog nerva podleže Valerijanovoj degeneraciji, koja je esencijalna kao pripremni stadijum za proces regeneracije aksona, kako bi se eliminisali molekuli koji bi mogli ometati regeneraciju.

Valerijanova degeneracija predstavlja proces aksonalne degradacije i posledične regeneracije, koji je posredovan neurogljom perifernog nervnog sistema (Švanovim ćelijama), kao i infiltracijom inflamatornih ćelija i regulisan je inflamatornim medijatorima kao što su citokini, hemokini i transkripcioni faktori koji učestvuju u inflamatornom odgovoru (slika 6) (Gaudet i sar., 2011). Deo ove neuroimunske signalizacije je posredovan komponentama urođenog imunskog sistema, uključujući derivate arahidonske kiseline, kao što su prostaglandini i leukotrijeni (Camara-Lemarroj i sar., 2012). Funkcionalni značaj regeneracije aksona je da se nadomesti distalni nervni segment, koji je izgubljen tokom degeneracije, omogućavajući na taj način reinervaciju ciljnih organa i restituciju njihovih odgovarajućih funkcija (Allodi i sar., 2012). U nedavnoj studiji je napravljena podela Valerijanove degeneracije na tri morfološki različita stadijuma uključujući akutnu degeneraciju aksona, period mirovanja i nagli granularni degenerativni stadijum usled razgradnje citoskeleta (Wang i sar., 2012).



Slika 6. Valerijanova degeneracija

U toku sat vremena od povrede, odumiranje i proksimalnog i distalnog dela je posredovano influksom kalcijuma i aktivacijom kalpaina, koji je odgovoran za cepanje neurofilamenata i komponenti kao što su spektrin i tubulin. U proksimalnom delu, ovakvo odumiranje se odigrava do prvog Ranvijerovog čvora. Sledeći stadijum (približno nakon 24h), tokom koga akcioni potencijali nastavljaju da se sprovode, je praćen dužim periodom razgradnje citoskeletnih proteina usled delovanja kalcijumom aktiviranog kalpaina i ubikvitin-proteazomnog sistema (Miledi i Slater, 1970; Zhai i sar., 2003). Transmisija se prekida mnogo brže ako je presečeni deo bliže sinaptičkom aksonskom završetku nego somi. Ako je distalni deo dovoljno dug, aksonski transport

može da se održava duže vreme i da snadbeva aksonski završetak odgovarajućim materijama koje su neophodne za sinaptički prenos (Quan i Bird, 1999). Švanove ćelije igraju glavnu ulogu u ovom procesu tako što su odgovorne za fagocitozu aksonalnih i mijelinskih ostataka tokom prva tri dana, a u ovom vremenskom periodu se odigrava proces narušavanja krvno-nervne barijere, uniformno duž nerva, što je neophodno kako bi bila omogućena kasnija invazija makrofaga. Takođe, Švanove ćelije sekretuju hemoatraktante kao što su IL-1 i monocitni hemoatraktantni protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), što za posledicu ima regrutovanje makrofaga do denervisanog, distalnog dela nerva, čime značajno doprinose fagocitozi ostataka aksona i mijelina (Sulaiman i sar., 2005; Hoke i Mi, 2007). Inhibitorni faktori povezani sa mijelinom, uključujući mijelin-asocirani glikoprotein, se uklanjaju. Ostaci mijelina oslobađaju mitogene koji promovišu deobu Švanovih ćelija po tipu mitoze i pokreću mrežu citokina i transkripcionih faktora, koji stimulišu invaziju makrofaga i označavaju mijelin za fagocitozu od strane Švanovih ćelija i makrofaga, usled čega se uspostavlja povoljna sredina za rast i regeneraciju aksona (Sulaiman i sar., 2005).

### **1.5.2. Promene u Švanovim ćelijama nakon lezije nerva**

Švanove ćelije imaju izuzetnu sposobnost da promene svoj fenotip i da se dediferenciraju kada izgube kontakt sa aksonima. Stoga, nakon periferne nervne povrede dolazi do smanjene ekspresije molekularnih markera koji su karakteristični za zrele Švanove ćelije. Ekspresija markera mijelina se drastično smanjuje kao posledica degeneracije aksona, dok se ponovo stiču markeri nezrelih Švanovih ćelija (Scherer i sar., 1994). Fenotip reaktivnih Švanovih ćelija podseća na fenotip nezrelih Švanovih ćelija i time se formira povoljno okruženje za regeneraciju. Ove ćelije se rediferenciraju kada ponovo stupe u kontakt sa aksonom.

Između prvog i petog dana nakon povrede, Švanove ćelije otpočinju proliferaciju i maksimum njihove aktivacije se dostiže oko četvrtog dana, a nakon toga se smanjuje tokom narednih nedelja (Gaudet i sar., 2011). Ova proliferacija igra ključnu ulogu tokom Valerijanove degeneracije. Sekundarna faza proliferacije se odigrava tokom regenerativnog procesa. Kako proliferišu unutar membrane endoneurijuma, Švanove ćelije formiraju Bingnerove (Büngner) trake, čime se postiže povoljna sredina za regeneraciju aksona. Nakon gubitka kontakta sa aksolemom, indukuje se ekspresija

nekoliko receptora za neurotrofne faktore na plazma membrani Švanovih ćelija i oslobađanje nekoliko neurotrofnih i neurotrofnih molekula. Denervisane Švanove ćelije povećavaju ekspresiju fibronektina, laminina, tenascina i nekih proteoglikana, koji formiraju povoljnu okolinu za izduživanje aksona. One takođe povećavaju ekspresiju nekoliko neurotrofnih faktora, kao što su faktor rasta nerva (engl. *nerve growth factor*, NGF), neurotrofni faktor poreklom od mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), neurotrofin 4 (NT-4), neurotrofni faktor porekla glijalnih ćelija (engl. *glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF) i insulinu slični faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1). Vremenski tok ekspresije nakon povrede je drugačiji za svaki faktor. Nasuprot tome, Švanove ćelije smanjuju produkciju proteina mijelina, kao i nekih drugih trofičkih faktora (Gillen i sar., 1997). Bliska pozicija regenerišućeg aksona i Švanovih ćelija olakšava intracelularni transfer neurotrofnih faktora posredstvom receptora. Kada Švanove ćelije jednom ostvare kontakt sa aksonom, suprimira se ekspresija neurotrofnih faktora i njihovih receptora, a kada neuronalni aksoni reinervišu ciljni organ, Švanove ćelije se vraćaju u stanje mirovanja (Taniuchi i sar., 1988). Regenerišući aksoni upućuju signale Švanovim ćelijama, što za posledicu ima zadobijanje zrelog fenotipa. Švanove ćelije motornih i senzornih nerava ekspimiraju različite molekulske markere, koji doprinose kapacitetu nekih aksona da se specifično regenerišu ka prikladnim putevima i reinervišu odgovarajuće ciljne organe (Politis i Spencer, 1981). Ova činjenica ukazuje da bi današnje tehnike, koje podrazumevaju premošćavanje praznina između delova nerva čiji je kontinuitet narušen, mogle biti poboljšane ukoliko bi uključivale poklapanje ćelijskih svojstava aksona i Švanovih ćelija. (Hoke i sar., 2006).

Uloga aktivnih Švanovih ćelija je ključna u regeneraciji aksona, na šta upućuje nizak stepen funkcionalnog oporavka nakon upotrebe acelularnih nervnih graftova, kako bi se nerv oporavio posle transekcije, a smanjenje kapaciteta Švanovih ćelija da u vremenu održe proregenerativan fenotip objašnjava ograničen kapacitet hronično denervisanih nerava da održe aksonalnu regeneraciju, ukazujući na važnost rane reparacije nerva i na strategije kojima bi se mogla ubrzati regeneracija (Hall, 1986; Gordon i sar., 2003).

### 1.5.3. Biologija izduživanja aksona

Regeneracija aksona podrazumeva transformaciju stabilnog segmenta aksona u visoko pokretljiv vrh, koji se označava kao kupa rasta, koja može da detektuje signale iz okruženja i usmerava rastući akson. Sposobnost formiranja kupa rasta zavisi od lokalne sinteze i degradacije proteina, koja je regulisana p38 MAPK i kaspaza-zavisnim putevima (Verma i sar., 2005). Veoma je važno da se kupa rasta izdužuje prateći endoneurijalnu tubu distalnog dela nerva, kako bi eventualno reinervisala odgovarajuće periferne ciljane organe. U distalnom delu, denervisane Švanove ćelije proliferišu na bazalnoj lamini endoneurijuma, formirajući kolone, koje se označavaju kao Bingnerove trake preko kojih napreduje kupa rasta (Bunge i sar., 1982).

U kupi rasta su uočljive tri funkcionalne i specifične oblasti: centralni domen (C-domen), tranzitorna zona (T-zona) i periferni domen (P-domen) (Bouquet i Nothias, 2007). T-zona se nalazi između C-domena bogatog mikrotubulama i P-domena bogatog aktinom. Polimerizacijom aktina se formira ispupčenje u membrani kupe rasta i time se olakšava isporuka novih mikrotubularnih elemenata u P-domen, kao i stabilizacija duž aktinskih snopova. Na ovaj način se obezbeđuju uslovi za premeštanje i napredovanje C-domena, kao i dalja integracija nastajućeg aksona. Dodavanje tubulina na distalni kraj mikrotubula koje ulaze u C-domen vodi ka polimerizaciji mikrotubula, dok visoke koncentracije miozina u T-zoni obezbeđuju kontrakcije aktinske mreže, indukujući formiranje aktin-filamentoznog luka. P-domen kupe rasta nosi lamelopodije, ispupčenja membrane od kojih se proteže nekoliko proširenja označenih kao filopodije.

Citoskeletni proteini regenerišućih perifernih aksona podležu kvalitativnim i kvantitativnim promenama, koje su veoma slične onima kroz koje rastući aksoni prolaze i tokom razvoja (Hoffman i Kleveland, 1988). Transekcijom motornih i senzornih vlakana dolazi do povećanja nivoa izoformi tubulina, aktina i periferina, a do smanjenja nivoa neurofilamenata, koji regulišu dijametar aksona. Povećani metabolički zahtevi rastućeg aksona se zadovoljavaju zahvaljujući procesima sinteze različitih komponenti, koje se anterogradno transportuju do vrha vlakna (Hoffman i Lasek, 1980; McQuarrie i sar., 1989). Tokom finalne faze integracije, nove mikrotubule se nagomilavaju u C-domen, verovatno posredstvom proteina koji su asocirani sa aktinom i mikrotubulama. Stabilnost i organizacija mikrotubula određuju da li će se omogućiti uslovi za formiranje kupe rasta, kao i sposobnost kupe rasta da izbegne inhibitorne signale (Erturk i sar.,



2007; Challacombe i sar., 1997). Faktori koji bi mogli biti uključeni u kontrolu formiranja mikrotubula, podrazumevaju kalcijum, ciklične nukleotide, posttranslacione modifikacije tubulina i proteina asociranih sa mikrotubulama (MAP) (Gordon-Weeks i Mansfield, 1992). Stabilnost mikrotubula takođe zavisi od strukturnih MAP (MAP1-MAP5) i tau proteina, a obe klase proteina indukuju polimerizaciju tubulina i ostaju vezani za novoformirane mikrotubule. Modifikacije mikrotubula određenim farmakološkim supstancama mogu uticati na promenu pravca i morfologije rastućeg aksona (Buck i Zheng, 2002). Ekstracelularni inhibitorni molekuli takođe mogu indukovati promene u morfologiji i dinamici vrha aksona tako što deluju na organizaciju mikrotubula (Erturk i sar., 2007).

Doprinos citoskeletnih proteina je krucijalan za aksonalnu regeneraciju (Lewis i Bridgman, 1992). Signali spoljašnje sredine koji navode izduživanje kupe rasta igraju veoma važnu ulogu, zahvaljujući interakcijama sa specifičnim receptorima na površini kupe rasta i zahvaljujući pokretanju kaskade citoplazmatičnih događaja, koji vode ka rearanžmanu citoskeleta, čime se obezbeđuje orijentisano izduživanje aksona. Na primer, lipidna ostrvca prisutna u kupi rasta amplifikuju signale navođenja, dok neurotrofini, na primer, ispoljavaju svoju hemoatraktivnu funkciju kroz ove mikrodomene (Fujitani i sar., 2005; Guirland i sar., 2004).

#### **1.5.4. Faktori rasta**

Faktori rasta imaju veoma važnu ulogu u determinaciji preživljavanja neurona, kako tokom razvoja, tako i nakon povrede. Lokalno prisustvo različitih faktora rasta ima veoma važnu ulogu, kako u kontroli preživljavanja, tako i u procesima migracije, proliferacije i diferencijacije različitih ćelijskih tipova uključenih u nervnu regeneraciju (Fu i Gordon, 1997). Pod fiziološkim uslovima, neneuronalne ćelije sintetišu i sekretuju nekoliko trofičkih faktora neophodnih za održavanje homeostaze intaktnih neurona. Švanove ćelije i nekoliko perifernih tkiva iskazuju bazalnu ekspresiju neurotrofnih faktora, koji imaju biološke funkcije u promovisanju preživljavanja i održavanja senzornih, motornih i autonomnih perifernih nerava. Nakon povrede nerva, ekspresija ovih neurotrofnih faktora raste, kako bi se podstaklo preživljavanje i rast regenerišućih aksona, kao i reinervacija denervisanih ciljnih organa. Preživljavanje nerva je olakšano aktivacijom od strane trofičkih faktora kao što su neurotrofini, neuroaktivni citokini,

IGF-1 i GDNF (Campbell, 2008).

#### 1.5.4.1. Neurotrofini i neurotrofni receptori

Familija neurotrofina uključuje NGF, BDNF i NT-3 i NT-4/5. Uloga BDNF-a u regeneraciji nerava je kontroverzna, iako se prisustvo njegovog receptora trkB čini esencijalnim, kako bi se održala aksonalna regeneracija (Boyd i Gordon, 2001). Uklanjanje endogenog BDNF-a negativno utiče na rast aksona i mijelinizaciju, dok lokalna infuzija BDNF-a poboljšava nervnu regeneraciju u neuralnim sponama (Vogelin i sar., 2006).

Receptori za neurotrofine se označavaju kao Trks i predstavljaju familiju protoonkogenih receptora. TrkA je visoko-afinitetni receptor za NGF i eksprimiran je u populaciji primarnih senzornih neurona (Bennett i sar., 1996). TrkB je visoko-afinitetni receptor za BDNF i NT-4/5 normalno ga eksprimiraju spinalni motoneuroni i srednje veliki senzorni neuroni (Mu i sar., 1993). Nakon aksonotomije, motoneuroni povećavaju ekspresiju TrkB (Ernfors i sar., 1993). TrkC je visoko-afinitetni receptor za NT-3 i njegovo prisustvo se može uočiti u spinalnim motoneuronima i u subpopulaciji velikih primarnih senzornih neurona (Mu i sar., 1993). Takođe, za neurotrofine postoji nisko-afinitetni receptor P75, čija se ekspresija povećava nakon povrede. Uloga ovog receptora je kontroverzna, jer on može vršiti i proapoptotske funkcije. Sledeći povredu perifernog nerva, dolazi do povišene ekspresije neurotrofnih receptora u distalnom delu nerva, u denervisanim Švanovim ćelijama i u kupama rasta regenerišućih aksona, iako je njihova ekspresija diferencijalno regulisana (Raivich i Kreutzberg, 1994).

#### 1.5.4.2. Insulinu slični faktori rasta

IGF-1 i IGF-2 su povezani sa endogenom regulacijom reparacionih i regeneracionih procesa. Uočeno je da obe izoforme podržavaju razvoj motoneurona, kao i preživljavanje posle aksonotomije (Pu i sar., 1999). Egzogeno primena ovog neurotrofnog faktora povećava brzinu aksonalne regeneracije i poboljšava funkcionalni oporavak (Glazner i sar., 1993). Povređeni neuroni iskazuju povišenu ekspresiju IGF-1 i IGF-2, kao i IGF vezujućih proteina (engl. *IGF binding protein*, IGFBP) 4 i 5. Poznato je da se ekspresija IGF-1 smanjuje tokom starenja i da kontinuirana primena ovog trofičkog faktora poboljšava regeneraciju aksona, kao i reinervaciju mišića kod ostarelih životinja (Apel i sar., 2010).

#### 1.5.4.3. Osteopontin

Osteopontin (engl. *osteopontin*, OPN) predstavlja glikoprotein, koji je snažno eksprimiran od strane makrofaga nakon povrede u centralnom, ali ne i u perifernom nervnom sistemu, što bi moglo objasniti zašto OPN inhibira rast aksona samo u centralnom nervnom sistemu (Kury i sar., 2005). Sa druge strane, OPN eksprimiraju mijelinizujuće Švanove ćelije intaktnih perifernih nerava. U periodu od prvog do četvrtog dana nakon aksotomije, nivo OPN-a prolazno raste u distalnom delu nerva i posle toga sledi njegova snižena ekspresija, koja postiže minimum 14 dana nakon nastanka lezije. Ovaj događaj ukazuje na ulogu ovog glikoproteina u regeneraciji perifernih nerava (Jander i sar., 2002).

#### 1.5.4.4. Neuroaktivni citokini

Određene studije ukazuju na to da se cilijarni neurotrofni faktor (engl. *ciliary neurotrophic factor*, CNTF) može smatrati faktorom povrede, koji se oslobađa od strane glijalnih ćelija nakon aksonotomije (Adler, 1993). Povišena ekspresija CNTF-a u Švanovim ćelijama povećava ekspresiju proteina mijelina i aktivira njihovu diferencijaciju. CNTF oslobođen nakon nervne lezije se vezuje za CNTF receptor, koji je pretežno lokalizovan u neuronima i ostvaruje parakrine efekte, promovišući ćelijsko preživljavanje i rast aksona (Hu i sar., 2005). Izgleda da ovaj neuroaktivni citokin igra važnu ulogu u reinervaciji i u promovisanju izrastanja aksona motoneurona (Siegel i sar., 2000).

Pokazano je da virusom-posredovana prekomerna ekspresija CNTF-a u Švanovim ćelijama povoljno utiče na regenerativni odgovor i u senzornim i u motornim neuronima. Leukemija inhibični faktor (engl. *leukemia inhibitory factor*, LIF) deli signalni put sa CNTF-om i smatra se da se uloge ova dva citokina preklapaju (Ip i sar., 1992). Švanove ćelije predstavljaju glavni izvor LIF-a, a nakon transekcije nerva, povećana je produkcija LIF-a od strane Švanovih ćelija na mestu lezije. *In vivo* studije ukazuju na ulogu LIF-a u promovisanju regeneracije motornih puteva, pošto njegova upotreba nakon povrede povećava mišićnu masu i snagu mišićne kontrakcije (Tham i sar., 1997). Motorni oporavak se pogoršava kod miševa, koji su deficijentni za LIF, a izgleda da je LIF esencijalan za preživljavanje senzornih i simpatičkih neurona, kao i za njihovu regeneraciju nakon povrede (Kurek i sar., 1997; Cafferty i sar., 2001).

Povećana pažnja je usmerena ka terapijama koje podrazumevaju primenu određenih faktora rasta, ali ovaj pristup predstavlja težak zadatak usled visoke biološke aktivnosti, plejotropnih efekata i kratkog poluživota ovih proteina (Tria i sar., 1994), pa je neophodno obezbediti lokalnu dostavu faktora rasta, kako bi se postigli adekvatni terapijski efekti sa što manje neželjenih reakcija. Lokalizovano oslobađanje neurotrofnih faktora se može obezbediti upotrebom različitih tipova nervnih spona ili cevi. Postoje različiti načini za lokalnu isporuku faktora rasta na mesto povrede, pa se tako mogu koristiti nerve cevi praznog ili punog lumena. Prednost praznog lumena je u prostoru za regeneraciju nerva, tako što se aksonima ostavlja mogućnost da selektivno reinervišu odgovarajuće ciljne organe. Nasuprot tome, nervne cevi punog lumena obezbeđuju prisustvo potpornih struktura, koje favorizuju ćelijsko urastanje i navođenje (Pfister i sar., 2007).

Nervne cevi mogu posedovati integrisane sisteme za isporuku ćelija koje proizvode nervne faktore, a sadašnje studije ukazuju na adipozne stem ćelije kao bogat izvor neurotrofnih i angiogenih faktora. Ove ćelije mogu da promovišu regeneraciju aksona tako što doprinose lokalnoj reparaciji podstičući vaskularizaciju (Kingham i sar., 2014).

Kombinacija dva ili više faktora rasta može ispoljiti sinergistički efekat na regeneraciju nerva, pogotovo ukoliko faktori rasta pripadaju različitim familijama i deluju preko različitih mehanizama. Može se očekivati da se različitim kombinacijama faktora rasta dodatno poboljša proces regeneracije nerva, naročito kada se isporuka svakog od njih obavlja drugačijom kinetikom. Kombinacija Švanovih ćelija i faktora rasta, kao i njihova kontrolisana isporuka može dodatno pospešiti nervnu regeneraciju, a ovakav sistem se može uspostaviti upotrebom uzdužno poravnatih vlakana, koja sadrže i isporučuju faktore rasta, pri čemu deluju i kao podrška Švanovim ćelijama (Pfister i sar., 2007).

## **1.6. INFLAMATORNI ODGOVOR NAKON POVREDE NERVA (SISTEMSKI STRES ODGOVOR)**

Tokom Valerijanove degeneracije, neutrofilni predstavljaju prve ćelije koje naseljavaju povređeno tkivo, vrše fagocitozu i aktiviraju druge leukocite, a makrofagi su

naredna populacija ćelija, koja na povredu perifernih nerava odgovara proliferacijom i fagocitozom mijelina (Shen i sar., 2000). Proliferacija i aktivacija endoneurijalnih makrofaga otpočinje u roku od dva dana nakon povrede nerva, pre nego što monociti iz cirkulacije nasele mesto povrede (Mueller i sar., 2001). Monociti, koji će se diferencirati u tkivne makrofage, su privučeni na mesto povrede citokinima i hemokinima produkovanim od strane Švanovih ćelija i rezidentnih makrofaga, a najznačajniji među njima su LIF, MCP-1 i TNF- $\alpha$  (Tofaris i sar., 2002). Narušavanjem krvno-nervne barijere u roku od 48h nakon povrede, omogućen je influks komponenti seruma, koje olakšavaju regrutovanje makrofaga i vrše opsonizaciju ćelijskih ostataka (Bruck i Friede, 1990). Makrofagi su ključni za efektivnu fagocitozu mijelina i produkciju citokina, koji aktiviraju Švanove ćelije, a takođe, učestvuju u remodelovanju ECM-a, kako bi ga učinili pogodnim za rast regenerišućeg aksona (La Fleur i sar., 1996).

T limfociti su poslednje ćelije koje pristižu na mesto povrede i koje produkcijom pro- i anti-inflamatornih citokina oblikuju kasnu fazu imunskog odgovora. Proinflamatorni citokini sekretovani od strane pomoćničkih T ćelija tip 1 (engl. *Type 1 helper cell*, Th1), kao što su faktor nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ ) i INF- $\gamma$ , aktiviraju makrofage, neutrofile i NK ćelije, dok anti-inflamatorni citokini produkovani od strane pomoćničkih ćelija tip 2 (engl. *Type 2 helper cell*, Th2), kao što su IL-4 i IL-10, pokreću alternativne funkcije makrofaga i modulišu pro-inflamatorne kaskade (Xin i sar., 2011).

## 1.7. DIJAGNOZA LEZIJE NERVA

Dijagnoza nerve lezije se može postaviti na osnovu:

- 1) kliničke slike i određenih kliničkih testova
- 2) elektrodijagnostičkim procedurama
- 3) neuroradiološkim ispitivanjem.

1. Tokom ***kliničkog pregleda*** posebnu pažnju treba obratiti na sledeće podatke: datum povrede, prirodu povrede, podatke o eventualnoj infekciji, znake oporavka, postojanje druženih povreda, prethodne hirurške intervencije.

Pregled pacijenta podrazumeva neurološko i lokalno ispitivanje, odnosno

eksplozaciju same rane i ožiljka. Na osnovu neurološkog ispitivanja može se odrediti stepen oštećenja nerva, tj. da li se radi o kompresiji ili o potpunom anatomskom ili funkcionalnom prekidu nerva, kao i faza regeneracije u kojoj se nerv nalazi (tabela 1).

Tabela 1. Kliničko testiranje perifernih nerava (preuzeto iz Grujičić i sar., 1998).

KOMPRESIJA NERVA		
	Motorni sistem	Senzitivni sistem
Rana (povišen prag nadražaja)	slabost	abnormalni prag za vibracioni i senzibilitet dodira
Kasna (smanjen denzitet inervacije)	hipotrofija	abnormalan test diskriminacije dve tačke
PRESEK NERVA		
	Motorni sistem	Senzitivni sistem
	bez funkcije	bez funkcije
REGENERACIJA NERVA		
	Motorni sistem	Senzitivni sistem
Rana	slabost	vibracioni senzibilitet za 30Hz zatim za 256 Hz, sa abnormalnim pragom
Kasna	porast snage i mase (nikad normalan)	poboljšanje praga za dodir (nikad normalan). Test diskriminacije dve tačke (mobilni pre i bolje od statičkog, nikad normalan)

Neurološko ispitivanje obuhvata testiranje motorne, senzorne (senzitivne) i vegetativne funkcija nerva.

#### Motorna funkcija

Ispituju se pokreti koji su uzrokovani kontrakcijama određenih mišića inervisanih od strane nerva koji ispituujemo. Snaga odgovora se predstavlja brojevima:

- 0 - ne postoji kontrakcija (procentualno 0%)
- 1 - kontrakcija koja ne pokreće zglob (10%);
- 2 - aktivan pokret u odsustvu sile gravitacije (20%);
- 3 - aktivan pokret protiv gravitacije (50%);
- 4 - aktivan pokret protiv određenog otpora (75%);
- 5 - normalna snaga (100%).

Merenje obima ekstremiteta, gde se za gornji ekstremitet meri obim na 10 cm iznad i ispod zgloba lakta i otvrđuje se stepen mišićne hipotrofije (Terzis i Smith, 1990).

#### Senzitivna funkcija

Svaki nerv ima zasebnu zonu senzitivne inervacije, ali su granice ovih teritorija izrazito varijabilne. Nakon povrede nerva, dolazi do stvaranja određenih zona ispada senzibiliteta:

- zona anestezije - gubitak taktilnog senzibiliteta, oštro ograničena;
- zona analgezije - nešto manja od prethodne, retko veća po površini;
- zona senzibiliteta za toplo i hladno (između prethodnih);
- zona proprioceptivnog senzibiliteta - unutar zone analgezije.

U zoni senzitivnog gubitka pacijent ima spontane senzacije koje imaju karakteristiku variranja i najjače su nekoliko nedelja posle povrede. Tokom prva tri dana posle povređivanja dolazi do suženja zone senzornog gubitka. Ovaj oporavak je rezultat oporavka terminalnih vlakana susednog nepovređenog nerva. U slučaju potpunog oporavka, u slučaju neuropraksije dolazi do cirkumferencijalnog sužavanja zone ispada senzibiliteta. Oporavak se dešava kasnije i napreduje ka periferiji u slučaju da je došlo do aksonske lezije i posledične regeneracije nakon reparacije. Za određivanje stepena oštećenja senzibiliteta se koriste razni testovi koji se mogu svrstati u nekoliko grupa (uglavnom se koriste u dijagnostici ispada senzibiliteta šake) (Grujičić i sar., 1998).

*Subjektivni testovi* zahtevaju saradnju sa pacijentom. *Fon Frajov (Von Frey) test modaliteta* se zasniva na mogućnosti/nemogućnosti pacijenta da oseti i prepozna toplotu, hladnoću, bol i laki dodir. *Zems-Vajnštajnov (Semmes-Weinstein) test* je

modernizovana verzija prethodnog testa

Za izvođenje *objektivnih testova* nije potrebna saradnja pacijenta i isključena je mogućnost simulacija ili disimulacije, odnosno agravacije. *Mobergov (Moberg) ninhidrinski test* se zasniva na reakciji ninhidrina i aminokiselina prisutnih u znoju i bazira se na činjenici da su znojne žlezde inervisane od strane simpatikusa i da u slučaju denervacije dolazi do smanjenja ili gubitka znojne sekrecije u denerviranoj regiji. *Test boranja O'Rajan (O'Rian)* podrazumeva činjenicu da se normalno inervisana koža prstiju šake se bora nakon određenog vremena provedenog u toploj vodi (oko 40 °C). U slučaju denervacije fenomen izostaje.

*Funkcionalni testovi* uključuju indirektno ispitivanje senzibiliteta putem ispitivanja finih pokreta šake za čije je izvođenje neophodan očuvan senzibilitet. *Mobergov pick up (pick up) test* se izvodi tako što se set od devet malih svakodnevnih predmeta se postavi pred pacijent i od njega se zahteva da pokupi predmete prvo povređenom rukom, potom zdravom, otvorenih, a potom zatvorenih očiju. *Veberov (Webber) test diskriminacije dve tačke* zasniva se na sposobnosti pacijenta da uoči razliku između dodira jednog i dva predmeta (uglavnom se koristi za palmarnu stranu šake, odnosno prstiju). Prilikom izvođenja *testa lokalizacije* od pacijenta se zahteva da lokalizuje dodir bez vizualizacije (Lawrence i Kashyap, 2000).

#### Vegetativna funkcija

U slučaju denervacije dolazi do ispada određenih vegetativnih funkcija. Jedna od najčešće ispitivanih je sekrecija znoja (spomenuta kod ninhidrinskog testa).

## 2. Elektrodijagnostika

Primena i korišćenje elektrodijagnostičkih metoda se zasniva na specifičnoj osobini nervnog i mišićnog tkiva koja podrazumeva njihovu nadražljivost odnosno elektropodražljivosti. Danas u svrhu ispitivanja lezija perifernih nerava i mišića koriste sledeće metode:

*Elektromiografija (EMG)* je metod kojim se registruje akcioni potencijal motornih jedinica u toku aktivne mišićne kontrakcije;

*Elektroneurografija (ENG)* omogućava merenje i ispitivanje brzine sprovođenja



impulsa duž motornih i senzitivnih nerava.

Najčešće se sprovodi kombinovano *elektromioneurografsko (EMNG)* ispitivanje.

Svrha ovih ispitivanja je razlikovanje nervne od mišićne, odnosno tetivne lezije; lokalizacija mesta lezije odnosno kompresivne neuropatije; razlikovanje aksonalne od demijelinizirajuće lezije i određivanje stepena oštećenja nerva kao i efekat terapije, odnosno oporavka. Pored ovih se koriste i razna refleksološka ispitivanja, kao i ispitivanje evociranih somatosenzornih potencijala (Quan i Bird, 1999).

### 3. Neuroradiološko ispitivanje

Radiografiju ekstremiteta potrebno je uraditi kod sumnje na dislokaciju, frakturu, prisustvo projektila. Cervikalnom mijelografijom se mogu prikazati korenski omotači i korenovi nerava. Kompjuterizovana tomografija jasno vizuelizuje kičmenu moždinu, duru i korenove. Magnetnom rezonancom se obezbeđuje jasna diferencijacija individualnih nervnih stabala i vaskularnih struktura od okolnog tkiva.

## **1.8. TERAPEUTSKI PRISTUPI U CILJU OPORAVKA NERVA NAKON POVREDE**

Pored hirurgije, razvijeni su i nehirurški pristupi, kako bi se dodatno poboljšao oporavak nerva nakon raznih trauma (Mackinnon i sar., 2001). Uprkos preciznim hirurškim tehnikama i raznim reparacionim metodama, potpun funkcionalni oporavak se veoma teško postiže, pogotovo ukoliko je u pitanju motorna funkcija (Lee i Wolfe, 2000).

U nekim slučajevima teških nervnih povreda, savetuje se odlaganje rekonstrukcije nerva sve dok se ostala tkiva, prvenstveno koža i mekotkivni pokrivač, ne oporave (Birch i Raji, 1991). U praksi, hirurškim intervencijama se vrši povezivanje, pod uslovom da se spajanje proksimalnog i distalnog dela nerva obavlja bez vršenja pritiska na njih i njihovog istezanja, dok je u suprotnom neophodno pristupiti upotrebi nervnih graftova, kako bi se premostila praznina između prekinutih delova nerva. Autograftovi se mogu koristiti kako bi se obezbedilo prisustvo molekula ekstraćelijskog matriksa i faktora rasta, koji bi promovisali regeneraciju aksona (Jesuraj i sar., 2012).

Godinama se istražuju različiti materijali za pravljenje veštačkih spona, kako bi se ograničila upotreba nervnih autograftova, jer su ovakvi graftovi povezani sa značajnim odumiranjem donorskih mesta, a sadašnja istraživanja upućuju na upotrebu faktora rasta, stem ćelija ili na njihovu kombinaciju, duž sintetičkih spona, kako bi se pospešila uspešnost premošćavanja praznina između delova presečenog nerva (Shea i sar., 2014).

### **1.8.1. Neoperativno lečenje**

Neoperativno lečenje se primenjuje praktično samo kod zatvorenih povreda kada se smatra da nije došlo do prekida kontinuiteta nerva i gde se znaci oporavka mogu očekivati unutar tri meseca. Od otvorenih lezija, na ovaj način se mogu tretirati samo injekcione povrede.

### **1.8.2. Fizikalna terapija**

Učinjeni su brojni pokušaji kako bi se povećao i/ili ubrzao oporavak nakon povrede perifernih nerava i smanjila ili sprečila atrofija odgovarajućih mišića. Električne stimulacije mogu direktno ispoljiti efekte na regeneraciju nervnog tkiva, a pozitivan ili negativan uticaj zavisi od snage električnog stimulusa (Geremia i sar., 2007; Lu i sar., 2009). Pokazano je da pacovi tretirani električnim stimulacijama uz vežbanje na traci za trčanje, ispoljavaju veći nivo mišićne reinervacije i da imaju povećan broj regenerisanih, mijeliniziranih aksona u odnosu na kontrolne životinje. Prilikom električne stimulacije, struja prolazi kroz telo preko igle elektrode, a prilikom magnetne stimulacije kratak magnetni puls proizvodi struju u tkivu (Barker, 1991). Magnetna stimulacija predstavlja neinvazivnu i skoro bezbolnu alternativu električnoj stimulaciji nerva. Mane ove tehnike su nedovoljan nivo odgovora u odnosu na odgovor postignut nakon električne stimulacije, kao i lokalizovanja tačnog mesta (Evans i sar., 1988).

Lasersko zračenje niskog inteziteta (laserska fototerapija) predstavlja još jedan modalitet tretmana za koji je pokazano da povećava i/ili ubrzava oporavak povredjenih perifernih nerava i smanjuje ili sprečava atrofiju odgovarajućih mišića, tako što indukuje povišenu ekspresiju nekoliko neurotrofnih faktora i proteina ekstraćelijskog matriksa, čime se pospešuje izrastanje neurona (Rochkind i sar., 2009; Byrnes i sar., 2005).

### 1.8.3. Operativno lečenje

Operativno lečenje povreda perifernih nerava je indikovano u sledećim slučajevima:

- 1) zatvorene povrede kod kojih ni posle tri meseca nema znakova regeneracije, tj. oporavka funkcije;
- 2) otvorene povrede sa jasnom parcijalnom ili kompletnom transekcijom;
- 3) bolni sindromi čak i ako se ne očekuje oporavak (kao što su bolni neuromi);
- 4) kompresivni sindromi.

Vreme operativnog lečenja

*Primarna neurorafija* se izvodi unutar 6-12 časova od trenutka povređivanja (eventualno do 24 časa).

*Odložena primarna neurorafija* izvodi se ukoliko su ispunjeni uslovi za primarnu neurorafiju, a ista nije izvedena (2.-18. dan nakon povrede) ili ukoliko sumnjamo na kontaminaciju rane.

*Sekundarna neurorafija* se koristi nakon ovog perioda ili ukoliko nismo u stanju da izvedemo operaciju ranije (infekcija, loš mekotkivni pokrivač, i dr.).

Krajnji termin u kome treba izvršiti rekonstruktivnu operaciju na perifernim nervima je šest meseci (Mackinnon, 1988). Drugi autori smatraju da je izvođenje rekonstruktivne operacije svrsishodno i nakon 12 meseci odnosno nakon 24 meseca. Odlaganje neuporedivo više utiče na oporavak motorike nego na oporavak senzibiliteta (Mackinnon, 1988; Bumbaširević i sar., 1995).

Oporavak motorike i senzibiliteta nikada nije potpun. Funkcionalni oporavak je dug proces i može se pravilno proceniti tek po isteku 3-5 godina nakon rekonstruktivne operacije (neurorafije ili grafta). Kod nekih specifičnih povreda kao što su injekcione i električne povrede, kao i prostreli primenjuje se primarno konzervativni pristup, a indikacije i vreme operativnog lečenja se razlikuju.

#### 1.8.3.1. Tehnike reparacije

Generalno govoreći, prilikom izvođenja neurorafije (bez obzira na tehniku) treba koristiti uvećenje (lupe ili mikroskop) radi bolje identifikacije neuralnih struktura.

Postoje dve osnovne tehnike suturiranja nerava, epineuralna i perineuralna.

*Epineuralna sutura* nerva podrazumeva da se suturni materijal se plasira u epineurijum proksimalnog i distalnog okrajka nerva. Prednosti ove tehnike su brzo i lako izvođenje, kratko vreme operacije i nizak stepen intraneuralne fibroze postoperativno. S druge strane, mana je slaba prociznost u smislu orijentacije i adaptacije fascikulusa.

*Perineuralna sutura* nerva podrazumeva da se suturni materijal plasira u perineurijum pojedinih fascikulusa (sinonimi: interfascikularna, funikularna). Prednosti ove tehnike su mnogo bolja adaptacija fascikulusa, dok su mane pojačano intraneuralno ožiljavanje, duže trajanje procedure i tehnički je zahtevnija. Ova tehnika se koristi se kod izvođenja fascikularne i grupne fascikularne reparacije (Roganović, 2005). Međutim, klinička ispitivanja nisu pokazala superiorne rezultate perineuralne suture.

Kao treća mogućnost, ponekada izvodi tzv. *epiperineuralna sutura* koja predstavlja kombinaciju prethodno navedenih tehnika.

#### **1.8.4. Faktori koji utiču na rezultate reparacije nerava**

##### 1.8.4.1. Faktori proksimalno od mesta lezije

Kod većine lezija, Valerijanova degeneracija se proksimalno odvija do nivoa prvog očuvanog Raniver-ovog nodusa. Međutim, u slučaju težih proksimalnih lezija (lumbosakralni i brahijalni pleksus), degeneracija se može očekivati do nivoa prednjih rogova kičmene moždine i senzitivnih ganglionu i njihovih neurona. U samom neuronu dolazi do promena u smislu degeneracije *Nislove (Nissl)* supstance. Ukoliko povreda nije teškog stepena, doći će do regeneracije struktura neurona do 12. dana. Kod ekstenzivnijih povreda koje izazivaju destrukciju neurona ili kod povreda na dva nivoa, rezultati reparacije će biti loši, bez obzira na tehnički kvalitet reparacije.

##### 1.8.4.2. Faktori na mestu povrede

Nivo povrede - što je povreda proksimalnije, aksoni treba da pređu duži put, produžava se vreme za koje oni stižu do ciljnih organa i uopšteno, rezultati su lošiji.

Tip nerva - kod čisto senzitivnih ili čisto motornih nerava bolji su rezultati nego kod mešovitih nerava (kod mešovitih može doći do neodgovarajuće orijentacije

fascikulusa, odnosno određenog poklapanja senzitivnih i motornih fascikulusa, što može otežati regeneraciju).

Vrsta agensa koji je uzokovao povredu i njegov intenzitet - najbolji rezultati se postižu kod oštih preseka nerava, dok su lošiji, nekada i veoma loši kod kraš (crush) i avulzivnih povreda. Nervi su posebno osetljivi na istezanje. Takođe, povrede na dva nivoa imaju lošiju prognozu.

Udružene povrede– teže povrede mogu rezultirati gubitkom okolnog mišićnog tkiva i/ili mekotkivnog pokrivača. Mogu biti oštećeni krvni sudovi koji obezbeđuju segmentalnu vaskularizaciju nerva (Bumbaširević i sar., 1995). Ekstenzivne povrede uzrokuju ekstenzivno ožiljavanje. Povrede dugih kostiju takođe mogu uzrokovati povrede perifernih nerava, što je čest slučaj kod povreda dijafize *humerus-a* (Bumbaširević i sar., 2010).

#### 1.8.4.3. Faktori distalno od mesta lezije

Distalni tubuli - distalni tubuli se sužavaju nakon degeneracije aksona do 70% svog prvobitnog promera tokom nekoliko nedelja ili meseci nakon povrede. Međutim, tubuli zadržavaju mogućnost proširenja (ali ne 100%) u slučaju da aksoni ponovo urastu u njih.

End organi - motorne ploče degenerišu neposredno po nervnoj leziji. One zadržavaju potencijal regeneracije ukoliko dođe do uspostavljanja kontinuiteta aksona. Mišići podležu hipotrofiji i fibrozi ukoliko nisu inervisani i njihova funkcionalnost predstavlja ograničavajući faktor u regeneraciji motorne funkcije.

Što se senzitivnih ciljnih organa tiče, oni veoma dugo zadržavaju mogućnost za regeneraciju, čak i do 20 godina. S druge strane, maksimalni vremenski period unutar koga se može očekivati određen stepen reinervacije mišića je oko 2 godine (Roganović, 2004).

#### 1.8.4.4. Ostali faktori

Najbitniji faktor koji utiče na rezultat regeneracije nerava su godine života, odn. starost pacijenta. Najbolji rezultati se postižu kod dece i, generalno, mlađih osoba. Pretpostavlja se da je u pitanju veća sposobnost mozga na adaptaciju na leziju. Godine života su toliko bitne da se hirurrg često odlučuje na primarni transfer tetiva kod lezija u starijih pacijenata, odn. kada ne očekuje adekvatnu regeneraciju.

Ukoliko je izvodljiva, primarna reparacija je metod izbora. Svako odlaganje (duže od nekoliko nedelja) dovodi do znatne retrakcije nervnih okrajaka, stvarajući veliku tenziju na mestu suture i zahtevajući nervni kalem. Nervna retrakcija se odvija tokom prve dve nedelje od povređivanja, tako da hirurg ipak ima određeno vreme (doduše ograničeno) na raspologanju za izvođenje primarno odložene, odn. rane sekundarne neurorafije.

Sekundarna neurorafija se primenjuje u slučaju neprepoznatih lezija ili u slučaju povrede koja zahteva druge prioritete lečenja (ratna rana, kontaminacija, defekt mekotkivnog pokrivača) (O'Brien i Morrison, 1987).

### **1.8.5. Adjuvantna terapija (vitamini B kompleksa)**

Vitamini B kompleksa (B1, B2, B3, B5, B6 i B12) su važni za normalno funkcionisanje nervnog sistema. Zbog svojih pozitivnih efekata na nervni sistem, kako centralni tako i periferni, često se primenjuju u terapiji različitih patoloških stanja na nervnom sistemu (Hoane i sar., 2003; Hoane i sar., 2005; Kuypers i Hoane, 2010). Oni obuhvataju široku grupu vitamina, od kojih su neki češće a neki ređe zastupljeni u terapiji.

#### **1.8.5.1. Vitamin B1 (Tiamin)**

Vitamin B1 je neophodan za normalan rast i razvoj organizma. Pozitivno utiče na brojne sisteme kao što su digestivni, kardiovaskularni i, pogotovo, nervni. Nedostatak ovog vitamina kod ljudi uzrokuje nastanak kardiovaskularnih bolesti (beriberi) i neruoloških poremećaja (Vernike-Korsakovljevi sindrom (Wernicke-Korsakoff), Parkinsonova (Parkinson) i Alchajmerova (Alzheimer) bolest) (Bubko i sar., 2015). Visoke doze B1 vitamina poboljšavaju koordinaciju mišića. B1 je uključen u katabolizam ugljenih hidrata (Itokawa, 1996), sintezu NADPH, ATP i formiranje nukleinskih kiselina. Tiamin difosfat predstavlja aktivni oblik vitamina koji funkcioniše kao specifični faktor za nekoliko enzima kao što su dehidrogenaza pirogroždane kiseline, dehidrogenaza  $\alpha$ -ketoglukurata, transketolaza. Ovi enzimi učestvuju u katabolizmu ugljenih hidrata i pokazuju smanjenu aktivnost pri nedostatku tiamina (Peković i sar., 1998; Bubber i sar., 2004.). Usled navedenog možemo zaključiti da tiamin ima važnu ulogu u energetskom metabolizmu mozga budući da su navedeni

enzimi od ključne važnosti za metabolizam glukoze u mozgu (Martin i sar., 2003). Oni koriste tiamin difosfat kao kofaktor i preuzimaju oko 80% od ukupne količine tiamina u nervnom sistemu (Ishii i sar., 1979).

#### 1.8.5.2. Vitamin B2 (Riboflavin)

Vitamin B2 je strukturni deo koenzima flavin adenin dinukleotida i flavin mononukleotida. Ovaj koenzim učestvuje u oksidoredukcionim reakcijama koje su glavni izvor energije za mnoge organizme. Vitamin B2 smanjuje otok nakon fokalne ishemije (Betz i sar., 1994) i poboljšava oporavak motornih funkcija u modelu kontrolisane kontuzione povrede čeone kore (Hoane i sar., 2005). Pretpostavljeni mehanizam je uklanjanje slobodnih radikala i smanjenje oksidativnog oštećenja.

#### 1.8.5.3. Vitamin B3 (Niacin)

Termin niacin odnosi se na nikotinamid, nikotinsku kiselinu i derivate koji ispoljavaju biološku aktivnost nikotinamida. Vitamin B3 u formi koenzima učestvuje u mnogim oksidoredukcionim reakcijama važnim za ćelijski metabolizam kao što su ćelijsko disanje, oksidacija energetski važnih molekula, biosinteza masnih kiselina i steroid, kao i oksidaciji glukozo-6-fosfata u ribozo-5-fosfat u pentoznom putu. Takođe, značaj B3 koenzima je i u replikaciji i popravci DNK, kao i u ćelijskoj diferencijaciji. Nikotinamid pokazuje neuroprotektivni efekat u animalnim modelima ishemije (Klaidman i sar., 1996, Ayoub i Maynard 2002).

#### 1.8.5.4. Vitamin B5 (Pantotenska kiselina)

Vitamin B5 predstavlja funkcionalni deo koenzima A (CoA). Koenzim A može delovati kao nosač acil grupe prilikom formiranja acetil-CoA (način transporta atoma ugljenika unutar ćelije). CoA je značajan za energetski metabolizam omogućavajući piruvatu da uđe u ciklus trikarboksilne kiseline kao acetil-CoA, kao i za transformaciju alfa-ketoglutarata u sukcinil-CoA unutar istog ciklusa. Koenzim A je značajan za sintezu masnih kiselina, holesterola i acetilholina. Nedostatak vitamina B5 dovodi do oštećenja perifernih nerava označenog kao „sindrom gorućih stopala“ (Murray i sar., 2012).

#### 1.8.5.5. Vitamin B6 (Piridoksin)

Vitamin B6 obuhvata grupu srodnih jedinjenja: piridoksin, piridoksal i piridoksamin. Oni se u telu metabolišu do piridoksal-fosfata, koji deluje kao koenzim u mnogim važnim reakcijama u krvi, nervnom sistemu i koži. Neophodan je za pravilno odvijanje procesa koji kontrolišu stvaranje slobodnih radikala. Pretpostavlja se da povećan nivo piridoksala može imati neuroprotektivni efekat (Hwang i sar, 2007). Poznati su neki od mehanizama neuroprotektivnog dejstva: povećanje afiniteta eritrocita za kiseonik, pojačavanje aktivnosti glikogen fosforilaze čime se povećava metabolizam glukoze što olakšava proizvodnju ATP u oštećenim ili hipoksičnim tkivima. Vitamin B6 poseduje anti-ekscitotoksični potencijal. Dugotrajna primena visokih doza vitamina B6 može uzrokovati neuropatiju (Perry i sar, 2004).

#### 1.8.5.6. Vitamin B12 (Cijanokobalamin)

Vitamin B12 čine kobalamin i njegovi analozi: cijanokobalamin, hidorksikobalamin, adenzilkobalamin i metilkobalamin. Vitamin B12 je neophodan za normalno funkcionisanje nervnog sistema i njegov nedostatak uzrokuje oštećenja bele mase kičmene moždine i mozga, što dovodi do periferne neuropatije. (Weber i sar, 1990). Takođe, neophodan je za normalno formiranje eritrocita, njegov nedostatak uzrokuje megaloblastnu anemiju. Metilkobalamin (Me Cbl) ima protektivnu ulogu na kortikalne neurone i ćelije mrežnjače (Akaike i sar, 1993; Kikuchi i sar, 1997). *In vivo* je pokazano da je vitamin B12 najefikasniji od svih B vitamina u regeneraciji perifernog nerva nakon traume i rekonstrukcije. Pozitivan efekat se ispoljava na nekoliko načina: B12 poboljšavanje preživljavanje neurona i izrastanje aksona nakon traume aktivacijom Erk1/2 i Akt protein kinaza (Okada i sar, 2010), olakšava prorastanje aksona iz proksimalnog u distalni deo povređenog nerva (Liao i sar, 2013), ima pozitivan efekat na proliferaciju Švanovih ćelija tokom regeneracije (Liao i sar, 2013), smanjuje broj aksona proraslih iz proksimalnog u distalni kraj nerva favorizujući aksone većeg dijametra na račun aksona manjeg dijametra i na taj način ograničava broj aksona koji će reinervisati motorne ploče i sprečava polineuronalnu reinervaciju dovodeći do boljeg funkcionalnog oporavka. Takođe, poboljšava mijelinizaciju aksona, odn. povećava dijametar mijelinskog omotača, ubrzava i poboljšava sazrevanje aksona. Ovi pozitivni efekti vitamina B12 su posledica njegove metaboličke aktivnosti. Poznato je da B12



promoviše aksonalni transport i regeneraciju (Yamatsu i sar 1976; Watanabe i sar 1994; Reyes Garcia i sar 2004). On deluje kao kofaktor enzima metionin sintetaze koji vrši transfer metil grupe u regeneraciji metionina iz homocisteina, na taj način povećavajući nivo metionina. Metionin, koji može biti metabolisan u acetilholin, povećava nivo acetilholina u aksonima i postsinaptičkim acetilholinskim receptorima i poboljšava razvoj i sazrevanje neuromuskularne ploče, (Vasilescu i Florescu, 1982; Sasaki i sar 1992; Yamazaki i sar 1994). Vitamin B12 ubrzava mijelinizaciju regenerišućih aksona povećanjem sinteze lecitina, glavnog konstituenta lipida mijelinskog omotača. Takođe, vitamin B12 podiže nivo metabolizma Švanovih ćelija detektovano povećanjem ekspresije S-100 proteina (Donato, 1999; Liao i sar 2010).

## **1.9. ANIMALNI MODELI POVREDE PERIFERNIH NERAVA**

Na osnovu svega navedenog možemo zaključiti da postoji više mehanizama koji doprinose uspehu ili neuspehu motorne reinervacije (Chen i sar., 2010). Da bi se ovi mehanizmi bolje istražili i razvile nove strategije lečenja, neophodno je identifikovati primarne ograničavajuće faktore koji se mogu eksperimentalno modulirati na način koji je klinički izvodljiv (Hoke, 2006). Za uspeh navedenih istraživanja bitno je razviti karakteristične, značajne i upotrebljive kvantitativne metode za procenu neurološke disfunkcije. Dodatno, istraživanje disfunkcije zahteva odgovarajuće, funkcionalno primenjive metode merenja. Konačno, treba uzeti u obzir da uspešna funkcionalna regeneracija može zavistiti od različitih faktora kod različitih eksperimentalnih modela.

### **1.9.1. Model povrede facijalnog nerva**

Facijalni nerv je „čist“ motorni nerv koji inerviše facijalne mišiće. Senzorni signal facijalnim motoneuronima je obezbeđen od strane trigeminalnog nerva preko ipsilateralne veze između senzitivnog jedra trigeminusa i facijalnog jedra ( McComas, 1998; Witehead i sar., 2005). Kao čist motorni nerv, facijalni nerv je kao model tokom prethodnih dekada omogućio prikupljanje velikog broja podataka o ćelijskim i molekularnim odgovorima motoneurona i njihovog okruženja na različite inzulte. Otažavajuća okolnost u upotrebi navedenog modela je relativno loš stepen oporavka nakon rekonstrukcije (svega 30-40% u odnosu na zdravu stranu) (Angelov 2007;

Guntinas-Lichius i sar., 2005).

### **1.9.2. Model povrede išijadičnog nerva**

Išijadični nerv je mešoviti nerv, sadrži motorne i senzitivne aksone. Motorni oporavak nakon povrede dostiže najviše 40% normalne funkcije i taj podatak, uz činjenicu da je procena oporavka motorne funkcije (*footprints walking* analiza je nisko precizna i ne korelira dobro sa EMG nalazom) teška, čini navedeni model ograničeno upotrebljivim za procenu uspešnosti motorne regeneracije (Nichols i sar., 2005). S druge strane, to je kompleksan model koji dovodi do neuropatskog bola i abnormalnog odgovora na termičke i taktilne stimuluse što je prednost modela pošto je neuropatski bol česta posledica povrede perifernog nerva kod čoveka (Eaton, 2003; Wall i sar., 1979). Mana je visok stepen komplikacija kao što je su automutilacija, pojava kožnih ulceracija i kontraktura zglobova (Nichols i sar., 2005). Zaključno, išijadični model je izazovan za istraživače zbog mnogo varijabli i nekoliko metodoloških nejasnoća. Verovatno je kompleksnost modela glavni ograničavajući faktor .

### **1.9.3. Model povrede femoralnog nerva**

Femoralni nerv je mešoviti nerv koji sadrži motorna vlakna za *m. quadriceps femoris* kao i senzitivna vlakna za inervaciju kože. Neposredno ispod ingvinalnog ligamenta, femoralni nerv se deli na dve, po dijametru, gotovo identične grane: senzitivnu, odn. kutanu granu, *n. saphenus*, i motornu granu za *m. quadriceps femoris*. Nakon presecanja nerva proksimalno od bifurkacije dolazi do izolovanog ispada funkcije kvadricepsa. Nakon nervne reparacije (suture), postoji podjednaka šansa da motorni aksoni za kvadriceps prorastu originalnim putem ka kvadricepsu ili da krenu pogrešnim putem, ka čisto senzitivnom safenoznom nervu. Navedena činjenica omogućava analizu celularnih i molekularnih mehanizama specifičnih za preferencijalnu motornu reinervaciju. Dodatno, model je interesantan zato što povreda izaziva ispad funkcije jednog mišića, kvadricepsa, koji ima jedinstvenu funkciju na velikom zglobu ekstremiteta, ekstenziju kolena. Mi smo u našem istraživanju vršili sekciju samo motorne grane femoralnog nerva, distalno od bifurkacije, ostavljajući senzitivnu, safenoznu granu intaktnu, s ciljem da se isključi mogućnost pogrešnog prorastanja aksona iz motornog u senzitivni deo i obrnuto. Na taj način smo se

fokusirali isključivo na praćenje i ispitivanje motorne regeneracije nerva, odnosno mišića isključujući mogućnost uticaja pogrešno usmerenih aksona na rezultat.

Jednostavnost motornog deficita dozvoljava jednostavan pristup funkcionalnoj analizi. Komplikacije kao što su automutilacija, kontraktura ekstremiteta i kožne ulceracije do sada nisu primećene (Irintchev, 2011).

## **1.10. PERITONEALNI MAKROFAGI**

Makrofagi (MF) predstavljaju heterogenu ćelijsku populaciju uključenu u uklanjanje apoptotskih ćelija i ćelijskog debrisu u fiziološkim uslovima, ingestiju mikroorganizama i njihovu eliminaciju, prezentaciju antigena i aktivaciju T limfocita, rezoluciju inflamacije, angiogenezu i regeneraciju tkiva. Peritoneum je često korišćen izvor MF za različita istraživanja (Ghosn i sar., 2010). Dobar deo znanja o biologiji MF potiče od analiza peritonealnih makrofaga (PMF) koji su postali široko korišćeni izvor MF zahvaljujući radu Cohn-a i saradnika 60-ih godina prošlog veka (Steiman i Morberg, 1994).

Peritoneum ili peritonealna šupljina je jedinstvena sredina u kojoj se nalaze različite ćelije imunskog sistema koje interreaguju međusobno. To je sredina sposobna da promoviše proliferaciju, diferencijaciju i aktivaciju rezidentnih peritonealnih makrofaga.

Inflamacija u peritoneumu je predmet mnogih studija, kako kliničkih, tako i eksperimentalnih. Ove studije pokušavaju da razjasne mehanizme uključene u inflamaciju peritoneuma kao i promene uzrokovane patogenima, različitim hirurškim procedurama itd. Malo je poznato o ulozi peritoneuma kao aktivnog imunskog organa. Poreklo i sudbina mnogih ćelija koje se nalaze u njemu je još uvek nerazjašnjena. O specifičnosti i nedovoljnoj ispitivosti procesa koji se dešavaju u peritonealnoj šupljini ukazuje i podatak da nanošenje iritirajuće supstance na šapu miša, dovodi do promena u broju makrofaga u peritonealnom lavatu. Promene u peritonealnoj šupljini zavise od tipa supstance (fiziološki rastvor, BCG, lipopolisaharid, tumorske ćelije) koja se nanosi na šapu miša. Autori ove studije sugerišu da uočene promene u peritoneumu nisu posledica lokalnog inflamatornog odgovora već moguće aktivacije perifernog nervnog sistema (Palos i sar., 2012).

U fiziološkim uslovima, u peritoneumu se nalaze MF, B limfociti (B-1 i B-2), T limfociti, NK ćelije, dendritske ćelije, kao i granulociti. Prema procentualnoj zastupljenosti, B-1 ćelije i MF čine najbrojnije ćelije peritoneuma miša (Cassado i sar., 2011). Kod pacova, najbrojnije ćelije peritoneuma su makrofagi (oko 70%). Pored MF, u peritoneumu pacova se nalazi i oko 13% limfocita i oko 13% granulocita (Glomarkaj i sar, 1999).

### **1.10.1. Subsetovi peritonealnih makrofaga**

Nedavno, Ghosn i saradnici (2010) su otkrili postojanje dva subseta PMF miša. Nazvali su ih “veliki” i “mali” PMF na osnovu razlika u njihovoj veličini. Do sada, nisu objavljeni slični nalazi u peritoneumu pacova ili ljudi.

Veliki makrofagi (engl. *Large peritoneal macrophages*, L-PMF) čine 90% makrofaga peritoneuma u fiziološkim uslovima, a preostalih 10% čine mali makrofagi (engl. *Small peritoneal macrophages*, S-PMF). Nakon stimulacije lipopolisaharidom ili tioglikolatom, S-PMF čine veći deo ćelija peritoneuma. Oni ekspimiraju Gr-1, AA4.1, visok nivo CD11b i F4/80, a ne ekspimiraju MHC-II. S druge strane, S-PMF ekspimiraju MHC-II, smanjena im je ekspresija CD11b i F4/80, a ne ekspimiraju Gr-1 i AA4.1. Pored navedenih, ovi subsetovi se razlikuju i u ekspresiji drugih markera (Ghosn i sar., 2010). Razlika između ova dva subseta se ogleda i u njihovoj funkciji i poreklu. L-PMF vode poreklo od embrionskog prekursora, imaju ulogu u održavanju tkivne homeostaze i ne diferenciraju se u S-PMF ili druge ćelije peritoneuma. S druge strane, S-PMF vode poreklo od monocita koji ulaze u peritoneum nakon stimulacije i u roku od 2-4 dana se diferenciraju u S-PMF. Ovaj tip MF je karakterističan za inflamaciju peritoneuma i mogu da se diferenciraju u L-PMF pod određenim uslovima. U prilog monocitnom poreklu S-PMF govori i podatak da stimulacija peritoneuma lipopolisaharidom ili tioglikolatom indukuje ulazak  $Ly6C^{hi}$  monocita koji se potom diferenciraju u S-PMF koje je, za sada, nemoguće razlikovati od S-PMF izolovanih iz peritoneuma intaktnih životinja. Takođe, pod određenim uslovima,  $Ly6C^{-}$  monociti mogu ući u peritoneum (Auffray i sar., 2007).

L-PMF mogu da odgovore na stimulaciju mikrobijalnim produktima *in vivo* i *in vitro*. S druge strane, S-PMF mogu da odgovore na ovu stimulaciju samo u adekvatnom miljeu mikrosredine. *In vivo*, obe populacije imaju sposobnost fagocitoze i proizvode

NO u odgovoru na LPS. *In vitro*, u odgovoru na LPS L-PMF proizvode NO, dok S-PMF nemaju ovu sposobnost. Produkcija NO-a je jedna od polaznih osnova M1/M2 klasifikacije makrofaga. Zahvaljujući različitom odgovoru L-PMF i S-PMF na lipopolisaharid u smislu produkcije NO, ove subpopulacije PMF se ne mogu uniformno definisati kao M1 ili M2 makrofagi. Dobar deo dosadašnjih istraživanja na PMF je rađen na PMF izolovanim nakon *i.p.* injekcije tioglikolata. Uzimajući u obzir da su Ghosn i saradnici pokazali da se 4. dana nakon stimulacije veoma mali broj L-PMF nalazi u lavatu, treba biti obazriv u razmatranju dosadašnjih rezultata i njihove interpretacije na S-PMF i L-PMF subsetove i imati u vidu da se veći dio njih odnosi na S-PMF.

Osim ove podele, postoji još jedna podela PMF miša. Dioszeghy i saradnici su takođe pronašli različite subsetove peritonealnih mijelo-monocitnih ćelija. Definisali su postojanje dva subseta MF sličnih ćelija na osnovu ekspresije 12/15- lipooksigenaze (12/15-lipoxygenase, LOX). 12/15-LOX<sup>+</sup> i 12/15-LOX<sup>-</sup> makrofagima slične ćelije imaju različite fenotipske i funkcionalne karakteristike. 12/15-LOX<sup>+</sup> ćelije imaju veći nivo ekspresije F4/80 i receptora čistača A (engl. *Scavenger Receptor A*, SR-A). Pored toga, sekretuju i više IL-10 i G-CSF u odgovoru na supernatant *Staphylococcus epidermis*-a u poređenju sa 12/15-LOX<sup>-</sup> MF. Autori su ovaj F4/80<sup>high</sup>12/15-LOX<sup>+</sup> subset definisali kao rezidentne MF koji su u fiziološkim uslovima prisutni u peritoneumu u sličnom broju kao L-PMF. S obzirom da dele slične funkcionalne i fenotipske karakteristike, F4/80<sup>high</sup>12/15-LOX<sup>+</sup> i L-PMF bi mogle biti iste populacije. S druge strane F4/80<sup>low</sup>12/15-LOX<sup>-</sup> ćelije i S-PMF verovatno nisu ista ćelijska populacija s obzirom da F4/80<sup>low</sup>12/15-LOX<sup>-</sup> ćelije ekspimiraju CD11c, dok S-PMF ne ekspimiraju ovaj molekul (Dioszeghy i sar., 2008).

Imajući sve navedeno u vidu Casado i saradnici su predložili jednostavan način identifikacije subsetova PMF protočnom citometrijom koristeći 4 fluorohroma. Prvi korak je isključivanje visoko pozitivnih CD19<sup>high</sup> i CD11c<sup>high</sup> ćelija (B-ćelija i dendritskih ćelija). Potom se na osnovu granuliranosti i ekspresije F4/80 uočavaju dve populacije F4/80<sup>+</sup> ćelija. Nakon toga, analizom ekspresije MHCII (IA<sup>b</sup>) molekula na F4/80<sup>+</sup> ćelijama mogu se razlikovati tri populacije: F4/80<sup>high</sup>IA<sup>b-neg</sup>, F4/80<sup>low</sup>IA<sup>b-high</sup>, F4/80<sup>low</sup>IA<sup>b-neg</sup> tj. L-PMF, S-PMF i granulociti (Cassado i sar., 2011).

### 1.10.2. Regulacija peritonealnih makrofaga

Širok je spektar molekula koji mogu da regulišu fenotipske i funkcionalne karakteristike PMF. Retinoična kiselina (engl. *retinoic acid*, RA), molekuli koji nastaju kao posledica aktivacije HPA ose, stres, starenje i drugi faktori samo su neki od načina regulacije PMF. Poznato je da proteini slični angiopoetinu koji pripadaju familiji 7 sekretornih glikoproteina, imaju ulogu u metabloizmu lipida, angiogenezi, aterogenezi, hematopoezi i inflamaciji (Thorin-Trescases i Thorin, 2014; Kadomatsu i sar., 2014). Pokazano je da angiopoetinu sličan protein 2, Angpt 2, reguliše aktivnost PMF tj direktno aktivira PMF miša. Ovaj efekat se ogleda u aktivaciji ERK, JNK, p38 NFkB signalnih puteve, povećanju ekspresije nekoliko inflamatornih gena uključujući NO sintazu 2, IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  (Zhang i sar., 2006).

Transkripcioni faktor GATA-6 je regulator tkivno specifične ekspresije gena u PMF. Ekspirira se na visokom nivou u PMF, ali se ne ekspirira u MF poreklom iz kostne srži, fetalne jetre ili u drugim tkivno-rezidentnim makrofagima, kao ni u S-PMF i neutrofilima (Sodhi i sar., 2006).

Istraživanja na miševima koji su deficijenti za ekspresiju GATA-6 molekula u MF su pokazala da se u peritonealnom lavatu ovih životinja nalazi manji broj L-PMF kao i da je smanjena ekspresiju F4/80 na ovim ćelijama. Ovaj transkripcioni faktor nije esencijalan za razvoj PMF, ali jeste za njihovu lokalizaciju u peritoneumu. Gubitak signala poreklom od GATA-6 i RA rezultuje akumulacijom makrofaga u omentumu (Maruya i sar., 2011). Nakon *i.p.* injekcije lipopolisaharida, dolazi do tzv. reakcije nestanka makrofaga (engl. *macrophage disappearance reaction*) i akumulacije GATA-6<sup>+</sup> MF oko specifičnih klastera (engl. *milky spots*) u omentumu (Okabe i sar., 2014). Pokazano je da ovi specifični klasteri predstavljaju ravnomerno raspoređene neprovidne strukture izgrađene od B-1 ćelija (Rangel-Moreno i sar., 2009).

S druge strane, za nastanak S-PMF značajan je CCR2 hemokinski receptor koji ima ulogu u privlačenju monocita tokom inflamacije. iRNK za ovaj receptor je visoko ekspimirana u S-PMF. Pored toga, u peritonealnom lavatu Ccr2 knockout miševa je značajno smanjen broj S-PMF, ali ne i L-PMF što ukazuje na to da je većina S-PMF monocitnog porekla (Okabe i sar., 2014).

Ekspresija GATA-6 i drugih gena specifičnih za MF indukovana je RA produkovanom u tkivu peritoneuma (Okabe i sar., 2014). Većina vitamina A u

organizmu se skladišti u jetri u vidu transkripciono neaktivnih metabolita i kontinuirano se otpušta u cirkulaciju (Hall i sar., 2011). Aktivacija transkripcije posredovana vitaminom A zahteva lokalnu konverziju neaktivnih metabolita u biološki aktivnu RA (Gudas i sar., 2012). L-PMF ili njihove prekursorke ćelije primaju signale od RA nakon što bivaju regrutovani u peritonealnu šupljinu. Enzimi koji konvertuju RA su na visokom nivou eksprimirani u omentumu. Zahvaljujući visokoj ekspresiji Raldh2, enzima odgovornog za konverziju retinal aldehyda u RA u peritoneumu tj. u omentumu se nalaze visoke koncentracije RA. Osim RA, različiti faktori poreklom iz omentuma sami ili u kombinaciji sa RA imaju ulogu u regulaciji različitih subsetova PMF. Pored GATA-6, RAR $\beta$  i NFE2 molekuli mogu imati ulogu u regulaciji PMF zahvaljujući visokoj ekspresiji u ovim ćelijama (Okabe i sar., 2014).

#### 1.10.2.1. Neurohumoralna regulacija peritonealnih makrofaga

Nervni i imunski sistem su povezani anatomski, ali i fiziološki. Mehanizam koji se nalazi u osnovi nastanka groznice koja prati infekciju je samo jedan od primera ove interakcije. Poremećaji u nekoj od komponenti jednog od ova dva sistema dovode do različitih patoloških procesa. Prekomerna aktivnost imunskog sistema dovodi do oštećenja mijelina kod multiple skleroze. S druge strane, nervni sistem utiče na različite komponente imunskog sistema i reguliše njihov odgovor. Holinergički parasimpatički nervni sistem može da modulira inflamatorni odgovor i aktivira anti-inflamatorne mehanizme. Borovikova i saradnici su pokazali da humani PMF oslobađaju manje TNF- $\alpha$  nakon tretmana acetil-holinom (ACh) kao i karbaholom (agonistom ACh). Ovaj efekat, ACh ostvaruje vezivanjem za svoje  $\alpha$ -bungarotoksin senzitivne, nikotinske receptore. Regulacija produkcije TNF- $\alpha$  se verovatno odigrava na posttranskripcionom nivou, blokadom sinteze TNF- $\alpha$  proteina. Pored inhibicije TNF- $\alpha$ , ACh inhibira i produkciju IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-18 na dozno zavisani način. S druge strane, ACh ne inhibira produkciju IL-10 što govori o anti-inflamatornom dejstvu holinergičkog parasimpatičkog nervnog sistema (Borovikova i sar., 2000).

Poznato je da stres utiče na ćelije imunskog sistema. U odgovoru na stres, dolazi do aktivacije HPA ose. Ova aktivacija podrazumeva aktivaciju hipotalamusa i povećanu produkciju kortikotropin oslobađajućeg hormona (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH). CRH deluje na hipofizu koja sada produkuje veću količinu

adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH svoj efekat ostvaruje vezujući se za receptore na nadbubrežnoj žlezdi, a krajnji rezultat je povećana produkcija kortizola. Pored stresa, i hirurška trauma dovodi do aktivacije imunskog sistema. Prvi hirurški rez dovodi do lokalne povrede tkiva, okolnih aferentnih nerava, krvnih sudova. Takođe, dolazi i do aktivacije nociceptora. Oštećenje nerva aktivira aferentne signalne puteve, signal se prenosi do CNS-a i dolazi do stimulacije HPA ose (Chen i sar., 2010). Dosadašnja istraživanja su pokazala da CRH, ACTH i kortizol, molekulu koji nastaju nakon aktivacije HPA ose, ostvaruju efekat na imunski sistem. Takođe, i kateholamini imaju uticaj na imunski sistem.

CRH svoj efekat ostvaruje direktno i indirektno. Indirektan efekat CRH ostvaruje putem krajnjih produkata dve velike ose odgovora na stres, HPA ose i simpatičkog sistema tj. putem kortizola i kateholamina. Pored toga, CRH oslobođen sa krajeva nervnih završetaka na samom mestu inflamacije direktno utiče na rezidentne imunske ćelije. Potrebno je naglasiti da CRH indirektno ostvaruje anti-inflamatorni, a direktno inflamatorni efekat (Webster i sar., 1998). Kada je u pitanju efekat CRH na PMF, Agelaki i saradnici su pokazali da CRH pojačava LPS-om indukovanu produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 *in vitro*. Takođe, oni su pokazali da blokada CRH receptora 1 *in vivo* pomoću sintetskih antagonista dovodi do manjeg porasta nivoa proinflamatornih citokina u poređenju sa kontrolom u modelu LPS-om indukovnog endotoksinskog šoka. Ovi rezultati pokazuju da difuzni neuroendokrini sistem ima mogućnost aktivacije PMF (Agelaki i sar., 2007). Uticaj CRH na PMF se objašnjava dosada poznatim efektima CRH. Naime, CRH dovodi do fosforilacije i aktivacije CREBP transkripcionog faktora u hipofizi, a ovaj transkripcioni faktor je odgovoran za transkripciju IL-1 $\beta$  (Waeber i sar., 1998). Pored toga, CRH aktivira ERK1/ERK2 MAPK kinazi put (Dermitzaki i sar., 2002) koji je značajan za produkciju TNF- $\alpha$  i AP-1 transkripcioni faktor koji je značajan za transkripciju TNF- $\alpha$  i IL-6 (Bamberger i Bamberger, 2000). Osim CRH, i drugi proteini iz ove familije stimulišu produkciju proinflamatornih citokina PMF nakon stimulacije LPS-om. Izlaganje PMF i makrofagne ćelijske linije RAW 264.7 CRH-u, urokortinu 1 (engl. *urocortin*, UCN) ili UCN 2 dovodi do povećane ekspresije TLR-4 kako na nivou iRNK tako i na novu proteina. Ovi molekuli aktiviraju PU-1 i AP-1 transkripcione faktore što za posledicu ima povećanu ekspresiju TLR-4 (Tsantsanis i sar., 2006). Istraživanje Tsantsanis-a i saradnika ukazuje



da urokortini mogu delovati i kao parakrini anti-inflamatorni molekuli ubrzavajući apoptozu MF. Treba spomenuti da je ovaj efekat primećen samo u opsegu niskih koncentracija ( $10^{-10}$ – $10^{-8}$  M) (Tsatsanis i sar., 2005).

U odgovoru na CRH, hipofiza luči ACTH. Receptori za ovaj molekul se nalaze, između ostalog, i na PMF. Pretpostavlja se da u stresnim situacijama, ACTH, kao i njegovi fragmenti mogu da imaju ulogu u transmisiji signala između neuroendokrinog i imunskog sistema. Istraživanja Altavilla i saradnici su pokazali da tretman ACTH peptidom, fragmentom ACTH-(1-24), smanjuje produkciju TNF- $\alpha$  od strane PMF u *in vivo* u modelu hemoragičnog šoka. Kada su u pitanju kontrolne, intaktne životinje, *in vivo* tretman ACTH-om nema efekat na produkciju TNF- $\alpha$  ali *in vitro* tretman PMF ovih životinja dovodi do smanjene produkcije TNF- $\alpha$  u odgovoru na LPS (Altavilla i sar., 1998). Takođe, ista grupa istraživača je pokazala da ACTH *in vitro* inhibira produkciju NO-a nakon stimulacije PMF LPS-om. Inhibicija je uočena na nivou NO-a ali i na nivou mRNA za iNOS na osnovu čega se može zaključiti da ACTH blokira aktivnost iNOS-a (Altavilla, 2000).

Ćelije imunskog sistema, među njima i MF su pod direktnim uticajem simpatičkog nervnog sistema. Rezidentni PMF konstitutivno ekspimiraju  $\alpha$ -1 i  $\beta$ -2 adrenergičke receptore (Dimitrijević i sar., 2009) za koje mogu da se vežu krajnji produkti aktivacije simpatičkog nervnog sistema, kateholamini. Vezujući se za ove receptore, kateholamini modulišu funkcije imunskih ćelija (Nance i Sanders, 2007). Zavisno od tipa receptora za koji se vežu, kateholamini imaju različit efekat na produkciju vodonik peroksida i NO-a (Dimitrijević i sar., 2009). Vezivanjem za  $\beta$ -adrenergičke receptore, kateholamini ometaju produkciju proinflamatornih citokina, pre svega TNF- $\alpha$  i IL-6 (Izeboud i sar., 1999). Pored ekspresije adrenoreceptora, o značaju kateholamina u regulaciji PMF govori i prisustvo tirozin hidroksilaze i noradrenalina u ovim ćelijama. PMF takođe imaju sposobnost sinteze noradrenalina (Dimitrijević i sar., 2009). Nekoliko studija je pokazalo da blokada  $\alpha$  i  $\beta$  adrenoreceptora *in vitro* utiče na sposobnost makrofaga da produkuju ROS, NO i citokine (Engler i sar., 2005; Dimitrijević i sar., 2009; Dimitrijević i sar., 2014). Pored noradrenalina, i adrenalin može da reguliše aktivnost PMF. Vezivanjem za  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 adrenoreceptore, on inhibira produkciju NO-a od strane LPS stimuliranih PMF (Sigola i Zinyama., 2000).

### 1.10.3. Efekat vitamina B kompleksa na peritonealne makrofage

Vitamini, među njima i vitamini B kompleksa mogu da utiču na različite komponente imunskog sistema. Qureshi i sar. su pokazali da vitamin B2 (riboflavin) suprimira produkciju NO-a i TNF- $\alpha$  od strane PMF izolovanih iz miševa. Imajuću u vidu da riboflavin inhibira proteazomnu aktivnost, pretpostavljeni mehanizam dejstva je smanjena proteolitička degradacija PikB proteina. Posledica ovoga je smanjena translokacija aktiviranog NF-kB iz citoplazme u nukleus i manja transkripcija gena za TNF- $\alpha$  i iNOS (Quershi i sar, 2013).

U skorije vreme je pokazano da nikotinamid (NA) ima niz anti-inflamatornih dejstava. Inhibira sintezu proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , iNOS-a, suprimira ekspresiju MHCII molekula. Pokazano je da NA na dozno zavisian način inhibira produkciju TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40, NO i PGE2 od strane LPS stimulisanih PMF. Nivo IL-10 se takođe smanjuje nakon primene NA, ali u manjoj meri što govori u prilog anti-inflamatornog dejstva NA. S druge strane, metilnikotinamida (MNA), glavni metabolita NA ne ispoljava efekat na PMF u ovom modelu (Biedron i sar., 2008).

Svoje efekte vitamin B3, niacin, ostvaruje putem GPR109A receptora. Ovaj receptor se nalazi pre svega na adipocitima, a poznato je da se niacin koristi u terapiji dislipidemije. Pored adipocita, receptor za niacin se nalazi i na slezini, plućima, limfocitima, MF što govori o ulozi niacina i njegovog receptora u imunskom sistemu. U odgovoru na LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1, zimozan, lipoteihoičnu kiselinu, PMF povećavaju ekspresiju GPR109A (Feingold i sar., 2014). Pored toga, tretman PMF niacinom dovodi do smanjene produkcije IL-6, IL-1 i TNF- $\alpha$  *in vitro*. Sličan efekat je primećen i nakon *in vivo* primene niacina. Takođe, primena niacina smanjuje produkciju citokina od strane PMF izolovanih iz aterogeničnih životinja (Lipszyc i sar., 2013).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Na osnovu literaturnih saznanja postavili smo **radnu hipotezu** da:

Hipervitaminska terapija vitaminima B kompleksa ubrzava i poboljšava oporavak motorne funkcije *n. femoralis* nakon povrede i rekonstrukcije. Povreda perifernog nerva i primena hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa utiču na funkciju peritonealnih makrofaga.

Na osnovu radne hipoteze postavljeni su osnovni **ciljevi istraživanja**:

1. Ispitati funkcionalne parametre mišića kvadricepsa (funkcija hodanja, električna aktivnost i atrofija) i ćelijske mehanizme u regeneraciji femoralnog nerva i mišića kvadricepsa nakon povrede i rekonstrukcije motorne grane (gustina ćelijskih jedara u području povređenog nerva i proces neuroreparacije praćen ekspresijom specifičnog markera izrastanja aksona GAP43; gustina Švanovih ćelija praćena ekspresijom specifičnog markera S100; prisustvo mijelin baznog proteina; prisustvo satelitskih ćelija tokom oporavka funkcije mišića praćeno ekspresijom markera Pax7, Ki67 i VCAM-1) neposredno nakon povrede perifernog nerva i tokom perioda oporavka, kao i uticaj hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na ove procese.

2. Ispitati efekat povrede perifernog nerva, kao i primenjene hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na funkciju peritonealnih makrofaga (metaboličku vijabilnost, sposobnost fagocitoze, adhezije, produkcije reaktivnih oblika kiseonika, azot oksida i citokina).

### **3. MATERIЈAL I METODE**

## **3.1. MATERIJAL**

### **3.1.1. Eksperimentalne životinje**

U ovom radu korišćeni su mužjaci pacova Albino Oxford (AO) soja, starosti od 75 do 90 dana i prosečne težine  $270 \pm 25$  g na početku eksperimenta. Životinje su dobijene iz vivarijuma Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Tokom eksperimenta životinje su boravile u uslovima kontrolisane temperature, vlažnosti i svetlosnog režima (12 sati svetlosti/12 sati tame), sa slobodnim pristupom hrani i vodi, po jedna životinja u kavezu.

#### **3.1.1.1. Saglasnost Etičkog komiteta**

Istraživanja su izvedena uz saglasnost Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, Republike Srbije broj 323-07-7363/2014-05/5. Odobrenje Etičkog odbora Vojnomedicinske akademije u sklopu Naučno-istraživačkog zadatka broj MFVMA4/13-15 je dobijeno pre samih studija. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa međunarodno prihvaćenim smernicama datim u "Vodiču za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja" (engl. *"Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth edition"*, National Academy Press, Washington, D. C., 2011). Životinje korišćene u eksperimentu su gajene u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu gde su i izvođene eksperimentalne procedure.

### **3.1.2. Reagensi i rastvori**

Spisak reagenasa i rastvora korišćenih za izvođenje testova i metoda u ovom istraživanju dat je u tabelama 2 i 3.

Tabela 2. Reagensi

Naziv	Proizvođač
3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromid (MTT)	Sigma Aldrich, SAD
Antibiotici (streptamicin i penicilin)	PAA Laboratories, Austrija
BSA (engl. Bovine serum albumin, Goveđi serum albumin)	Sigma, Nemačka
Dimetilsulfoksid, DMSO	Sigma, Nemačka
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bez fenol red-a	Sigma Aldrich, SAD
Etilendiaminotetraacetat (EDTA)	AppliChem, Nemačka
Fetalni goveđi serum (engl. Fetal calf serum, FCS)	PAA Laboratories, Austrija
Fluorescentna boja za jedra, DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol)	Invitrogen, SAD
Forbol miristat acetat, PMA	Sigma, Nemačka
Kompleks B vitamina (liofilizat za rastvor za injekciju za 2ml) Vitamin B1 u obliku tiamin-hidrohlorida 40mg Vitamin B2 u obliku riboflavin-natrijum-fosfata 4mg Vitamin B3 u obliku nikotinamida 100mg Vitamin B5 u obliku kalcijum-pantotenata 10mg Vitamin B6 u obliku piridoksin-hidrohlorida 8mg Vitamin B12 u obliku cijanokobalamina 4µg	Galenika AD, Beograd
Lipopolisaharid, LPS	Sigma, Nemačka
Metilensko plavo	Sigma, Nemačka
Neutral red	Sigma, Nemačka
Nitro blue tetrazoliumova (NBT) so	Sigma Aldrich, SAD
Opti prep gradijent	Axis Shield, Norveška
RPMI-1640 Medium	Sigma Aldrich, SAD
Saharoza	Sigma, Nemačka
SDS (engl. Sodium dodecyl sulfat)	Sigma, Nemačka
Tripan	Sigma, Nemačka
Triton X-100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Nemačka
Tween 20	Sigma, Nemačka

Tabela 3. Rastvori

	Sastav i proizvođač
DAB (3,3-diaminobenzedine)	DAKO, SAD
DPX (mountant for histology)	Fluka, Švajcarska
Etanol	100%, 96%, 70% Moss Hemos, Srbija
Fiziološki rastvor	0.9% NaCl (Merck, Nemačka)
Moviol	9.6g Mowiol-a (Calbiochem, EMD Millipore, SAD); 24ml glicerola (Lach Ner, Češka)
Normal donkey serum (serum magarca)	Sigma, Nemačka
sirćetna kiselina (min. 99.5%)	Kemika, Hrvatska
Hlorovodonična kiselina (min. 99.5%)	Kemika, Hrvatska
PBS sa $\text{NaN}_3$	495ml PBS, 5ml 1% $\text{NaN}_3$ ( <i>Sigma Aldrich</i> , SAD)
PBS sa $\text{NaN}_3$ i FCS	490 ml PBS sa $\text{NaN}_3$ , 10 ml FCS
Kanada blazam	Kemika, Hrvatska
Ksilol	Kemika, Hrvatska
May-Grunwald	Alkaloid, Makedonija
Giemsa	Merck Chemicals, Nemačka
0.1% naftil-etilendiamin-dihidrochlorid	0.1g naftil-etilendiamin-dihidrochlorid (Merck), 100 ml destilovana voda
2% Pararozanilin	
1% sulfanilamida u 5% $\text{H}_3\text{PO}_4$	1g sulfanilamida (Merck), 100 ml 5% $\text{H}_3\text{PO}_4$
$\text{H}_2\text{O}_2$ (33% vodonik peroksid)	Centrohem, Beograd, Srbija
0.01 M Na-fosfatni pufer (engl. Phosphate Buffer Saline, PBS)	50ml 0.2M Na-fosfatni pufer, 8.7 g NaCl i do 1000 ml $\text{mqH}_2\text{O}$
0.02 M PBS	0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Merck, Nemačka) 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Merck, Nemačka) $\text{mqH}_2\text{O}$ pH 7.4



Citratni pufer, pH 6	1g limunske kiseline, 6.10g Tri-Na-citrat, 500 ml dH <sub>2</sub> O
4% PFA, pH 7.4	40g paraformaldehid (Sigma, Nemačka) 500 ml dH <sub>2</sub> O 1M NaOH 500ml 0.2M Na-fosfatni pufer
Metanol (99,8%)	Moss Hemos, Srbija

### 3.1.3. Antitela

Spisak korišćenih primarnih i sekundarnih antitela je dat u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Primarna antitela

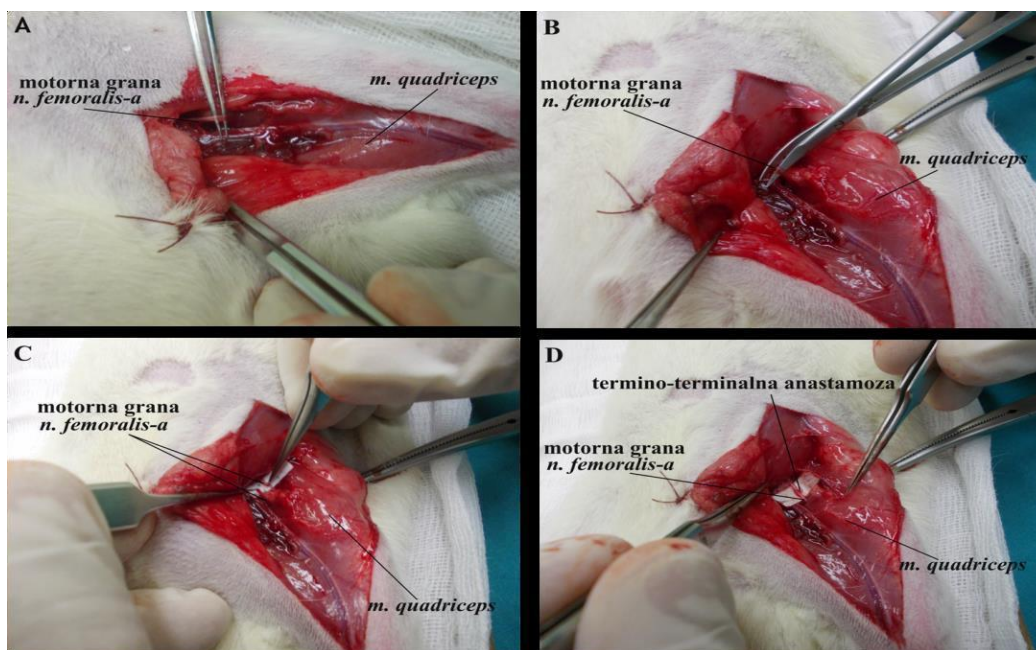
Specifičnost	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
anti- GAP- 43	zec poliklonsko	Millipore	1:500 IF
anti-GFAP	zec poliklonsko	Dako	1:500 IF
anti-MBP	miš monoklonsko	BioLegend	1:500
anti-S100	zec poliklonsko	Sigma	1:200
anti-S100β	miš monoklonsko	Santa Cruz	1:100 IF
anti-CD68	miš monoklonsko	AbD Serotec	1:50 PC; 1:200 IF
anti-CD11b	miš monoklonsko	AbD Serotec	1:50 PC
anti-CD80	miš monoklonsko	AbD Serotec	1:50 PC
anti-CD86	miš monoklonsko	AbD Serotec	1:50 PC
anti-CD54	miš monoklonsko	AbD Serotec	1:50 PC
anti-Pax	zec poliklonsko	Sigma	1:50
anti-Ki67	kozje poliklonsko	Santa Cruz	1:200 IF
anti-VCAM1	zec poliklonsko	Santa Cruz	1:100 IF

Tabela 5. Sekundarna antitela

Specifično za	Konjugovano	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
kozu	HRP (peroksidaza rena)	magarac	Dako	1:200
kozu	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200
miša	Biotin	konj	Vector Laboratories	1:50
miša	HRP (peroksidaza rena)	koza	Santa Cruz	1:200
miša	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:200
miša	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200
pacova	HRP (peroksidaza rena)	zec	Dako	1:20
zeca	Alexa Fluor 488	magarac	Invitrogen	1:200
zeca	Alexa Fluor 555	magarac	Invitrogen	1:200

### **3.2. EKSPERIMENTALNI MODEL POVREDE MOTORNE GRANE FEMORALNOG NERVA PACOVA**

Kontrolisana transekcija perifernog nerva dobro je opisan model za proučavanje regeneracije povređenog nerva. Životinje starosti 2.5 do 3 meseca su anestetizirane intraperitonealnom (*i.p.*) primenom ketamina (50 mg/kg; Ketalar, Eczacibasi, Turkey) i ksilazina (5 mg/kg; Rompun, Bayer, Turkey). Nakon toga izvršena je transekcija motorne grane femoralnog nerva levog zadnjeg ekstremiteta distalno od razdvajanja femoralnog nerva na motornu i senzitivnu granu. Životinja je položena u ležeći položaj na operacionom stolu i ekstremiteti su fiksirani za podlogu. Izvršena je incizija kože i uz upotrebu hirurškog mikroskopa iz okolnog tkiva je izdvojena motorna grana femoralnog nerva, posle čega je presečena. Nakon toga, proksimalni i distalni segment nerva su direktno spojeni i zašiveni 9.0 hirurškim najlon koncem tehnikom termino-terminalne anastomoze, a potom je koža zašivena 3.0 hirurškim najlon koncem (Peters Surgical, Paris, Francuska) (slika 7).

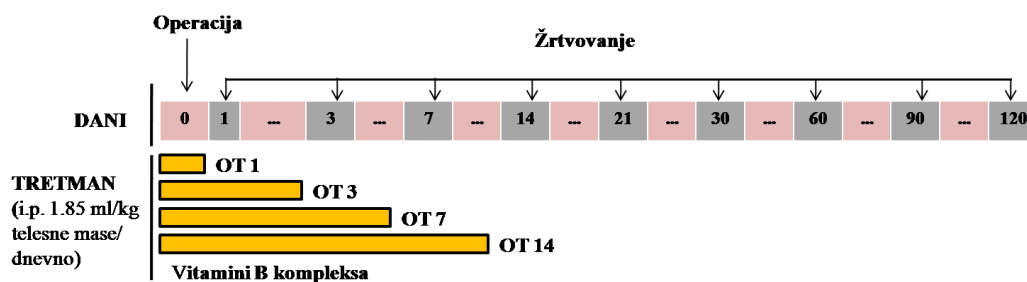


Slika 7. Prikaz eksperimentalne procedure. (A) Preparacija motorne grane femoralnog nerva. (B) Transekcija motorne grane femoralnog nerva. (C-D) Rekonstrukcija motorne grane femoralnog nerva tehnikom termino-terminalne anastomoze.

### 3.2.1. Eksperimentalne grupe i tretman životinja

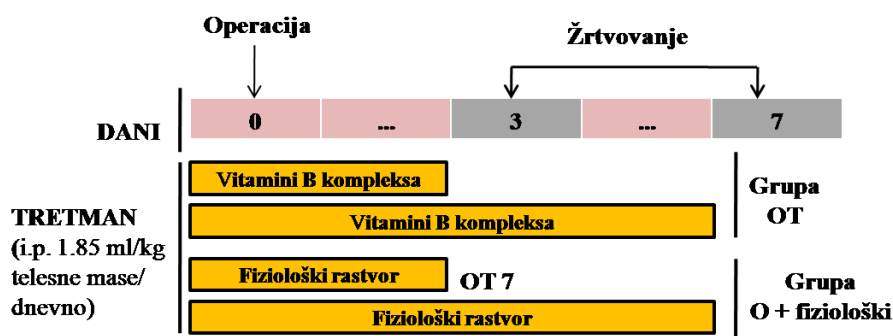
Životinje su podeljene u eksperimentalnu i kontrolnu grupu. Životinjama eksperimentalne grupe, tzv. “operisanim” životinjama (O), je izvršena unilateralna transekcija motorne grane femoralnog nerva, koja je odmah nakon toga rekonstruisana tehnikom termino-terminalne anastomoze koristeći hirurški konac 9.0 (Ethicon Inc, Norderstedt, Germany). Životinje kontrolne grupe, tzv. “lažno operisane” životinje (L), prošle su istu eksperimentalnu proceduru, ali im nije izvršena transekcija nerva. Poslednju treću grupu su činile intaktne životinje. Prvo je svim korišćenim testovima u prvom delu ispitivanja pokazano da ne postoje razlike između intaktnih i „lažno operisanih“ životinja, pa stoga dalje u ovom delu istraživanja grupa intaktnih životinja nije korišćena. Ispitivanja su vršeni u devet vremenskih tačaka tokom perioda oporavka i to 1., 3., 7., 14., 21., 30., 60., 90. i 120. dana oporavka (slika 8). Svaku eksperimentalnu i kontrolnu podgrupu za svaki ispitivani termin su činile po 4 životinje. Za prva četiri termina ispitivanja eksperimentalna grupa životinja je podeljena na još dve podgrupe: podgrupu koja je operisana i nije imala dodatni tretman (O) i podgrupu u

kojoj su životinje operisane i tretirane kompleksom vitamina B (OT) (slika 8). Životinje OT grupe su od dana operacije do dana žrtvovanja primale terapiju vitaminima B kompleksa. Terapija je podrazumevala *i.p.* injekciju u dozi 1.85 ml/kg telesne mase/dnevno, a prvu dozu su primile odmah nakon operacije.



Slika 8. Shematski prikaz dizajna prvog dela eksperimenta

Sve životinje korišćene u eksperimentu su podvrgnute istom setu analiza. Pre žrtvovanja svim životinjama je izmerena telesna masa. Prvi test koji je izvođen je test hodanja koji se koristi za procenu funkcionalnog oporavka motorne funkcije pogođenog mišića. Potom je vršeno elektromiografsko merenje kao metod za direktnu procenu oporavka mišića kvadricepsa. Nakon izvršenog merenja izolovani su femoralni nervi (*n. femoralis*) (rekonstruisani i kontralateralni) i mišići kvadricepsi (*m. quadriceps*) (ipsilateralni mišić inervisan rekonstruisanim nervom, kao i *m. quadriceps* inervisan kontralateralnim, intaktnim nervom). Masa mišića kvadricepsa je takođe izmerena i ovaj podatak je korišćen za izračunavanje procenta atrofije ispitivanog mišića u odnosu na ukupnu telesnu masu. Izolovani mišići i nervi su dalje korišćeni za histološku analizu.



Slika 9. Shematski prikaz dizajna drugog dela eksperimenta

U drugom delu istraživanja koji se odnosio na ispitivanje peritonealnih makrofaga je korišćena i grupa intaktnih životinja. Grupe eksperimentalnih, „lažno operisanih“ i intaktnih životinja za ovaj deo istraživanja su podeljene u 3 podgrupe, sastavljene od po tri do četiri životinje. Prvu podgrupu su činile životinje koje su od dana hirurške intervencije do dana žrtvovanja svakodnevno dobijale *i.p.* fiziološki rastvor (1.85 ml/kg/dnevno), drugu podgrupu su činile životinje kojima je *i.p.* primenjivan rastvor vitamina B kompleksa (1.85 ml/kg/dnevno) a životinje treće podgrupe nisu tretirane (tabela 6 i slika 9). Kao i u prvom delu istraživanja životinje su prošle istu eksperimentalnu proceduru i potom su im izolovane ukupne ćelije peritoneuma postupkom peritonealne lavaže. Odmah nakon izolacije određena je *ex vivo* metabolička aktivnost i izvršena je morfološka analiza izolovanih ćelija. Potom su ukupne ćelije peritonealnog lavata prečišćene na gradijentu gustine, i podvrgnute su procedurama za procenu fenotipskih i funkcionalnih karakteristika. Određen im je fenotip, metabolička vijabilnost, sposobnost fagocitoze, adhezija, kao i sposobnost produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxigen species*, ROS), azot monoksida (NO) i citokina. Testovi za procenu funkcionalnih karakteristika su rađeni *ex vivo* odmah nakon izolacije i *in vitro* nakon 24h inkubacije u sterilnim mikrotitarskim pločama sa 96 mesta.

Tabela 6. Grupe životinja korišćene za ispitivanje peritonealnih makrofaga

Dodatni tretman	Eksperimentalne grupe		
	Životinje kojima je izvršena unilateralna transekcija i rekonstrukcija motorne grane femoralnog nerva	Životinje koje su prošle istu eksperimentalnu proceduru kao i operisane životinje ali im nije izvršena transekcija nerva	Intaktne životinje
nema	O	L	I
<i>i.p.</i> primena fiziološkog rastvora	O + fiziološki	L + fiziološki	I + fiziološki
<i>i.p.</i> primena rastvora vitamina B kompleksa	O + vitamin	L+ vitamin	I + vitamin

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Test ponašanja/hodanja**

Za procenu oporavka motorne funkcije korišćen je test hodanja (ponašanja), koji se zasniva na analizi pojedinačnih video zapisa (Irintchev i sar., 2005). Povreda femoralnog nerva uzrokuje nesposobnost podupiranja telesne mase tokom pojedinačnih faza hodanja neophodnih za zamah kontralateralne noge. Da bi se procenio ovaj deficit, životinje su snimane tokom hodanja pored grede upotrebom obične kamere. Promena u hodu pacova uočljiva je u poziciji kada su prsti u fazi odvajanja od podloge, pri čemu je palac rotiran ka unutra. Ovaj poremećaj je povezan sa smanjenom funkcijom ekstenzije kolena koja je posledica povrede femoralnog nerva. Ugao koji formiraju zamišljena linija koja deli stopalo pacova na pola i zamišljena, horizontalna linija na površini kojom se životinja kreće predstavlja parametar koji je korišćen za procenu poremećaja hodanja. Ugao je meren u poziciji kada su prsti u fazi odvajanja od podloge, a stopalo je paralelno transverzalnoj ravni. Vrednosti ugla su izmerene obradom u Adobe Photoshop CS6 programu (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA).

#### **3.3.2. Elektrofiziološka procena oporavka**

Elektromiografija (EMG) je dijagnostička procedura za procenjivanje stanja mišića i motoneurona koji ih inervišu. Za snimanje EMG-a korišćen je Animal&Human Physiology Transducer sistem (iWorx/CBScience Inc, Washington Center, USA).

Merenje EMG-a je vršeno neposredno pre žrtvovanja u svim ispitivanim terminima. Životinje su anestetizirane na već opisan način, postavljene u ležeći položaj, i svi ekstremiteti su im fiksirani. Za zadnji desni, neoperisani ekstremitet flasterom je pričvršćena elektroda za uzemljenje. Pod aseptičnim uslovima, na jednom, a onda i na drugom zadnjem ekstremitetu napravljen je rez, čime je omogućen pristup nervu i mišiću. Akcioni potencijali mišića kvadricepsa su snimljeni nakon stimulisanja femoralnog nerva. Motorna grana femoralnog nerva je stimulisana proksimalno od mesta suture korišćenjem stimulatorne elektrode, dok su na mišić kvadriceps postavljene monopolarne elektrode.

### **3.3.3. Procena atrofije mišića**

Nakon žrtvovanja životinja, mišići izolovani iz operisanog i kontralateralnog ekstremiteta su izmereni. Mase izolovanih mišića su korišćene za izračunavanje procenta atrofije mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim nervom po formuli:

$$\frac{[(\text{masa kontralateralnog mišića} - \text{masa operisanog mišića}) / \text{ukupna telesna masa}] \times 100}{}$$

### **3.3.4. Priprema preparata za histološku i imunohistohemijsku analizu**

Nervi i mišići operisanog i kontralateralnog ekstremiteta izolovani su iz po četiri životinje svake eksperimentalne grupe i fiksirani u formalinu. Nakon 24h vršena je dehidracija fiksanog uzorka u seriji rastvora alkohola rastuće koncentracije (70% alkohol 2h, 96% alkohol 2h, 100% alkohol 1.5h, 100% alkohol 1.5h), pa prosvetljavanje (ksilol dva puta po 45 minuta) i na kraju parafinizacija (parafin oko 12h). Nakon parafinizacije vršeno je kalupljenje tkiva. Kalupi su postavljeni na hladnu ploču (temperatura oko -10 do 12<sup>0</sup>C) kako bi se parafin stegao i mogao izvaditi iz kalupa. Tkivo je sečeno na mikrotomu, a potom je naneto na staklo i sušeno u termostatu na temperaturi od 50 do 60<sup>0</sup>C. Ovaj postupak je vršen u laboratoriji za patohistološku i citološku dijagnostiku HistoLab. Na ovaj način pripremljeno tkivo je korišćeno za hematoksilin i eozin bojenje kao i za imunohistohemijsku analizu. Pre bojenja, vršena je deparafinizacija ksilolom u trajanju od 5-10 minuta, kao i rehidracija kroz rastvore alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%) i na kraju u destilovanoj vodi.

3.3.4.1.        Određivanje gustine jedara mišića kvadricepsa i femoralnog nerva

Preparati sa presecima mišića i nerva su obojeni hematoksilinom i eozinom i pokriveni pokrovnim staklima. Hematoksilin boji jedro, a eozin boji citoplazmu. Nakon bojenja se vrši ispiranje pločica u seriji alkohola rastuće koncentracije i rasvetljavanje u ksilolu. Nakon bojenja, preparati su montirani medijumom DPX, pokriveni pokrovnim ljupticama i bili su spremni za posmatranje pod mikroskopom. Ovo bojenje je urađeno u u laboratoriji za patohistološku i citološku dijagnostiku HistoLab, Beograd. Potom su tako obojeni mišića kvadricepsa i femoralnog nerva posmatrani pod svetlosnim

mikroskopom (Leica, Solms, Germany), i slikani pri uvećanju od 40 puta u centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta. U slučaju mišića, pravljeno je 20 fotografija različitih regiona preseka. U slučaju nerva vršeno je slikanje ukupne površine preseka, nakon čega su napravljene fotografije spajane u mozaik celog preseka. Za brojanje jedara i određivanje njihove gustine (broj jedara/mm<sup>2</sup>) korišćen je ImageJ program za obrađivanje slika (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

#### 3.3.4.2. Imunohistohemijska analiza preseka mišića kvadricepsa i femoralnog nerva

Imunohistohemijska (engl. *immunohistochemistry*, IHC) analiza je proces lokalizacije određenog molekula na preparatima tkiva koji se zasniva na reakciji antigena i antitela. Za vizuelizaciju interakcije antigena i antitela korišćeno je imunofluorescentno (IF) bojenje prilikom kog se za primarno neobeleženo antitelo vezuje sekundarno antitelo konjugovano fluorescentnom bojom. Primarna antitela su specifična za molekule od interesa, a sekundarna antitela su specifična za Fc fragment imunoglobulina vrste u kojoj je produkovano primarno antitelo.

Čitav postupak se odvija na sobnoj temperaturi, osim inkubacije u primarnom antitelu koja se odvija na 4°C. Svi rastvori su pravljeni u 0.01 M PBS-u, pH 7.4 koji je služio i za ispiranje nakon određenih proceduralnih koraka.

- Za bolju detekciju antigena, pre postupka imunohistohemije, vršeno je demaskiranje antigena (antigen retrieval) kuvanjem u citratnom puferu pH 6 (8 min na 350°C), koje ima za cilj bolje otkrivanje antigena, jer u toku fiksacije tkiva dolazi do formiranja veza između iz fiksativa i antigena.
- Preseci se nakon hlađenja i ispiranja (3x5 min, PBS) inkubiraju oko 60 minuta u odgovarajućem 5% serumu. Na taj način se blokiraju sva mesta nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela.
- Ovako pripremljeni preseci su ostavljeni preko noći na 4°C u rastvoru primarnog antitela u PBS-u koji je sadržao i odgovarajući 1% blokirajući serum (za detekciju unutarćelijskih molekula, ovaj rastvor je sadržao i 0.1% Triton X-100). Nevezana antitela su uklonjena dužim ispiranjem u PBS-u.
- Zatim su, u zavisnosti od prirode primarnog antitela, stavljena sekundarna



antitela konjugovana nekom fluorescentnom bojom koja se specifično vezuju za već prisutna primarna antitela (korišćena primarna i sekundarna antitela kao i njihova razblaženja mogu se naći u tabelama 4. i 5.). Inkubacija je trajala dva sata, a potom je vršeno ispiranje (3x5 min, PBS).

- Za dvostruko imunofluorescentno bojenje, nakon dodavanja sekundarnog antitela i ispiranja, ponovljena su prethodna tri koraka (dodavanje blokirajućeg seruma, novog primarnog i odgovarajućeg sekundarnog antitela)
- Nakon ispiranja od viška sekundarnog antitela, preparati su inkubirani 20 minuta u prisustvu DAPI boje koja se koristi za vizualizaciju jedara (vezuje se za DNK). Nakon ove inkubacije preseći su ispirani u PBS-u.
- Za montiranje preparata, na pločice sa presecima se nanosio moviol i pokrovna stakalca.

Kontrole za IF su prošle kroz istu proceduru kao i svi preseći osim što je izostavljen korak u kome se dodaje primarno antitelo. Kod takvih kontrola nije bilo imunopozitivne reakcije, što je ukazivalo na odsustvo nespecifičnog vezivanja antitela.

Svi pripremljeni preparati su analizirani upotrebom Zeiss Axiovert mikroskopa (Axio Observer Microscope Z1, ZEISS) i fotografisani digitalnom kamerom, sa uveličanjem objektiva 2.5x, 5x, 10x, 20x i 40x, na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Kolokalizacija na fluorescentnim slikama određena je upotrebom AxioVision Rel. 4.6 programa, koji ide uz Zeiss Axiovert mikroskop.

### **3.4. PERITONEALNI MAKROFAGI**

Makrofagi su izolovani postupkom peritonealne lavaže, sedmog dana nakon što su životinje operisane. Na osnovu životinja iz kojih su izolovani, PMF su podeljeni u tri grupe: PMF operisanih životinja (O-PMF), PMF “lažno” operisanih životinja (L-PMF) i PMF intaktnih životinja (I-PMF). Ove grupe su dodatno podeljene na tri podgrupe na osnovu tretmana koji su životinje primale. Prvu podgrupu čine životinje koje nisu imale dodatni tretman, drugu podgrupu životinje koje su od dana operacije do dana žrtvovanja *i.p.* tretirane fiziološkim rastvorom, a treću podgrupu čine životinje koje su od dana operacije do dana žrtvovanja *i.p.* tretirane rastvorom kompleksa vitamina B.

### **3.4.1. Izolacija peritonealnih makrofaga**

Životinjama je intraperitonealno ubrizgano 20 ml hladnog PBS/NaEDTA. Nakon blagog masiranja abdomena životinje, telesni zid je otvoren i prikupljena je tečna faza. Dobijena suspenzija je centrifugirana 10 minuta (1400 rpm, 4°C), nakon čega je talog resuspendovan u medijumu sa 10 % FCS. Vijabilnost ćelija, kao i njihov broj je određivana brojanjem ćelija u Tripan plavom. Pre daljeg prečišćavanja, za dalju analizu (procenu metaboličke aktivnosti, morfološku i fenotipsku analizu) odvojen je deo na ovaj način dobijene populacije ukupnih peritonealnih ćelija.

Potom je izvršeno prečišćavanje ukupne populacije ćelija peritonealnog lavata na gradijentu (40% Optiprep) u cilju dobijanja obogaćene populacije PMF. Uzorak ćelija resuspendovan u zapremini od 3.9 ml pomešan je sa 2.1 ml pripremljenog 40% Optiprep gradijenta (dobija se mešanjem dva volumena koncentrovanog Optiprep gradijenta i jednog volumena rastvora DMEM medijuma bez fenol red-a) i nakon blagog mešanja na ovako pripremljenu suspenziju ćelija polako se naliva 1 ml serum free RPMI medijuma tako da ovi slojevi ostanu razdvojeni. Ovako pripremljen uzorak se centrifugirana 20 minuta (2970rpm, 4°C). Nakon centrifugiranja, izdvaja se beličasti prsten mononuklearnih ćelija u kojima dominiraju mononuklearne ćelije. Ćelije iz ovog sloja su pažljivo pokupljene i isprane dva puta u kompletnom RPMI medijumu sa 10% FCS-a. Vijabilnost i broj ćelija je određivan brojanjem ćelija u Tripan plavom. Nakon prebrojavanja ćelija vršena je njihova fenotipska i funkcionalna karakterizacija.

### **3.4.2. May-Grünwald Giemsa bojenje preparata**

Citospin preparati sa ukupnim peritonealnim ćelijama ispitivanih životinja su korišćeni za morfološku analizu prisustva različitih populacija ćelija. Po 100 µl ćelijske suspenzije ( $2.5 \times 10^4$  PMF po preparatu) naneto je u levkove sa montiranim mikroskopskim pločicama koje su prethodno premazane poli-L-lizinom i centrifugiranje je vršeno pet min na 30 g u citocentrifugi (MPW-35, Poljska). Ovako pripremljeni citospin preparati prelivevani su May-Grünwald rastvorom (Merck KGaA, Nemačka) i inkubirani 5 min. Po isteku inkubacije, preparati su isprani destilovanom vodom i potom tretirani 15 min Giemsa rastvorom (razblaženja 1:10 u destilovanoj vodi), (Merck KGaA, Nemačka). Nakon inkubacije, preparati su ponovo isprani destilovanom vodom,

a zatim osušeni na sobnoj temperaturi i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom OLYMPUS CX31 (*Olympus*, Japan).

### 3.4.3. Imunocitohemija

Citospin preparati sa peritonealnim makrofagima ispitivanih životinja su korišćeni za imunocitohemijsko bojenje. Na gradijentu gustine prečišćena i obogaćena populacija PMF je isprana u RPMI medijumu sa 2% FCS-a. Nakon toga je po 100  $\mu$ l ćelijske suspenzije ( $2.5 \times 10^4$  PMF po preparatu) naneto u levkove sa montiranim mikroskopskim pločicama koje su prethodno premazane poli-L-lizinom i centrifugiranje je vršeno pet min na 30 g u citocentrifugi (MPW-35, Poljska). Tako pripremljeni citospin preparati su korišćeni za određivanje ekspresije CD68 molekula metodom imunocitohemije koja se zasniva na reakciji antigena i antitela. Za uočavanje ove interakcije korišćeno je imunoperoxidazno bojenje, gde je primarno antitelo neobeleženo, a sekundarno je konjugovano sa biotinom ili enzimom peroksidazom rena (engl. *Horse Radish Peroxidase*, HRP) koja može da pokrene bojenu reakciju. Kao hromogen za ovaj tip reakcije je korišćen DAB, koji nakon razlaganja enzimom peroksidazom rena razvija specifičnu braon boju.

- Pre same imunocitohemije, ćelije su fiksirane upotrebom 2% pararozanilina.
- Potom, su pločice isprane u PBS-u i ćelije su permeabilizovane pomoću 0.5% TritonX-100 kako bi se omogućio ulazak antitela u citoplazmu
- Nakon toga, pločice su ponovo isprane u PBS-u, a potom je vršena inkubacija ćelija u prisustvu odgovarajućeg blokirajućeg seruma (20 min)
- Ovako pripremljene ćelije su inkubirane u rastvoru primarnog antitela u PBS-u jedan sat. Potom su sva nevezana primarna antitela uklonjena dužim ispiranjem u PBS-u.
- U zavisnosti od prirode primarnog antitela, korišćeno je odgovarajuće sekundarno antitelo koja se specifično vezuje za već prisutno primarno antitelo (korišćena primarna i sekundarna antitela kao i njihova razblaženja mogu se naći u Tabelama 4. i 5.). Inkubacija je trajala 30 minuta.

- Nakon ispiranja, za vizuelizaciju formiranih kompleksa antigena i antitela korišćen je DAB koji reaguje sa peroksidazom rena i u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se formira kompleks braon boje. Reakcija se prekida ispiranjem u česmenskoj, pa u destilovanoj vodi.
- U sledećem koraku je vršeno kontrastiranje hematoksilinom, a potom ispiranje u česmenskoj vodi
- Za montiranje preparata korišćen je kanada balzam i pokrovna stakalca.

#### 3.4.4. Protočna citometrija

Nakon obogaćivanja populacije PMF prečišćavanjem na gradijentu gustine primenom protočne citometrije određivana je ekspresija CD80, CD86, CD11b, MHCII, CD54 i CD68 molekula. Korišćena su mišija monoklonska antitela (mAt) (tabela 4) specifična za pacovske antigene, konjugovana biotinom ili direktno obeležena FITC-om i avidin-fluorohrom kompleksom za vizuelizaciju.

PMF su neposredno pre dodavanja primarnog mAt isprane u hladnom rastvoru PBS i NaN<sub>3</sub> na 1800 rpm tokom osam minuta na +4°C. Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u rastvoru PBS-a i NaN<sub>3</sub> do koncentracije od 1x10<sup>5</sup> ćelija u 50μl po epruveti za protočnu citofluorometriju. U suspenziju ćelija su dodata mAt u finalnim razblaženjima prikazanim u tabeli 4. Ćelije su potom inkubirane 30 minuta na +4°C, a potom isprane u rastvoru PBS-a i NaN<sub>3</sub> (centrifugiranjem na 1800 rpm, osam minuta, na hladnom) i fiksirane u 4% formalinu. Kontrolu su činili uzorci sa adekvatnim irelevantnim mišijim mAt konjugovanim odgovarajućom fluorescentnom bojom.

Fenotip obeleženih ćelija je analiziran na EPICS XL-MCL protočnom citofluorimetru (Coulter, Krefeld, Nemačka), prema protokolima kreiranim u SYSTEM™ II software programu. Detaljna analiza je izvedena primenom FCS Express 4 Flow Research Edition software programa (Tree Star Inc., SAD). Rezultati citofluorimetrijske analize predstavljeni su kao numerička vrednost procenta obeleženih ćelija, srednje vrednosti intenziteta fluorescence (engl. *mean fluorescence intensity*, mfi) i u obliku histograma fluorescence. Jednparametarski histogrami su predstavljeni intenzitetom fluorescence na x osi i logaritamskom skalom broja analiziranih ćelija na y osi. Mfi predstavlja aritmetičku sredinu intenziteta fluorescence pojedinačnih događaja (ćelija) izraženu u relativnim brojevima kanala fluorescencije (0-1024). Analizirano je

najmanje 5000 ćelija po uzorku. Nivo nespecifične fluorescence određivan je u uzorcima koji su inkubirani sa irelevantnim mAt.

Za određivanje ekspresije CD68 molekula u PMF vršena je permeabilizacije ćelija.

### **3.4.5. Određivanje metaboličke aktivnosti**

Metabolička aktivnost makrofaga se može detektovati kolorimetrijskom metodom redukcije difenil tetrazolijum bromidne soli (MTT). Ovom metodom se detektuje funkcija mitohondrijalnih enzima, što može da ukaže na broj metabolički aktivnih ćelija. Vijabilne ćelije preuzimaju MTT i redukuju ga, prevodeći žuto obojeni rastvor MTT-a u sivo-crne kristale u mitohondrijama. Izolovane ćelije ukupnog peritonealnog lavata i prečišćene PMF su postavljeni u mikrotitarsku ploču koja ima 96 bunarića u koncentraciji  $1 \times 10^5$  ćelija/udubljenju bez i u prisustvu stimulatora, u četvoroplikatima. Kao stimulator je korišćen lipopolisahard (LPS) u koncentraciji 100 ng/ml ćelijske kulture. U svako udubljenje je dodato po 10 $\mu$ l MTT-a koncentracije 5mg/ml. Ćelije u mikrotitarskoj ploči su inkubirane tokom tri sata u standardnim uslovima, nakon čega je reakcija zaustavljena smešom SDS-HCl (10ml 10% SDS i 0.1ml 1N HCl). Nakon 24h inkubacije, meren je intenzitet apsorbance. Apsorbanca je određivana pomoću ELISA spektrofotometra (Behring ELISA Processor, Behring, Germany) na talasnoj dužini 570nm (referentna 650nm). Određivana je metabolička aktivnost makrofaga *ex vivo*, kao i *in vitro* nakon 24h inkubacije.

### **3.4.6. Test fagocitoze**

Za procenu fagocitozne (pinocitozne) sposobnosti makrofaga korišćen je kolorimetrijski esej. Ćelije obogaćene populacije PMF su postavljene u mikrotitarsku ploču koja ima 96 bunarića u koncentraciji  $1 \times 10^5$  ćelija/udubljenju sa i bez stimulatora, u četvoroplikatima. Kao stimulator je korišćen LPS u finalnoj koncentraciji 100 ng/ml ćelijske kulture. Nakon završene inkubacije (1h za *ex vivo* analizu, 24h za *in vitro* analizu) uklonjen je medijum, a u svaki bunarić je dodato po 50 $\mu$ l Neutral red-a (razblaženje 1:300). Posle inkubacije od četiri sata, supernatant je odliven, a makrofagi su isprani tri puta u PBS-u. Potom su u cilju detekcije fagocitovanog neutral red-a makrofagi lizirani dodavanjem 100 $\mu$ l rastvora za lizu (1:1 etanol i 1% sirćetna kiselina)

po bunariću i inkubacija je trajala dva sata u standardnim uslovima kako bi se fagocitovana boja oslobodila i rastvorila. Intenzitet apsorbance formiranog obojenog rastvora je meren pomoću ELISA spektrofotometra (Behring ELISA Processor, Behring, Germany) na talasnoj dužini 570nm (referentna 650nm).

### **3.4.7. Test adhezije za nećelijski matriks**

Za procenu spontane i indukovane adhezije makrofaga za nećelijski matriks (plastiku) korišćen je modifikovani kolorimetrijski esej po Oez-u i sar. (1990). U bunariće mikrotitarske ploče stavljeno je po  $5 \times 10^5$  ćelija obogaćene populacije PMF u prisustvu ili odsustvu forbol miristat acetata (PMA) u koncentraciji 250 ng/ml kulture. Nakon dva sata inkubacije u standardnim uslovima neadherentne ćelije su uklonjene ispiranjem ploče tri puta toplim PBS-om. Potom su adherentne ćelije fiksirane dodavanjem metanola (7 minuta), i bojene 0.1% rastvorom metilenskog plavog u PBS u trajanju od 15 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon isteka perioda inkubacije, vršeno je ispiranje česmenskom vodom (3x) i ploče su ostavljene na vazduhu da se suše. Boja je rastvorena dodavanjem po 200 $\mu$ l 0.1N HCl u svaki bunarić. Intenzitet rastvorene boje, koji je direktno srazmeran broju živih ćelija zalepljenih za plastiku, izmeren je na spektrofotometru na talasnoj dužini od 650nm (referentna 570nm).

### **3.4.8. Test redukcije tetrazolijumske soli**

Aktivirani makrofagi vrše redukciju tetrazolijumske soli (NBT) do monoformazana, a zatim do diformazana, uz pomoć enzima NADPH oksidaze. Potencijal ćelija da stvaraju reaktivne oblike kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) se može odrediti merenjem redukcije NBT-a. Količina redukovanog NBT *in vitro* je mera aktivacije MF, tj. proporcionalna je količini superoksida produkovanog od strane aktiviranih makrofaga (Monboisse i sar, 1991). Nivo aktivnosti se detektuje na osnovu promene boje, jer je oksidovana forma NBT žuta, a redukovan diformazan je plav do sivo-crni. Ćelije obogaćene populacije PMF su postavljeni u mikrotitarsku ploču koja ima 96 bunarića u koncentraciji  $1 \times 10^5$  ćelija/bunarići bezi u prisustvu stimulatora, u četvoroplikatima. Kao stimulator je korišćen PMA u koncentraciji 250 ng/ml ćelijske kulture. U svaki bunarić se dodaje po 10 $\mu$ l NBT koncentracije 5mg/ml. Ćelije se inkubiraju tokom 30-60 minuta na 37°C, nakon čega je redukcije NBT-a zaustavljena

smešom SDS-HCl (10ml 10% SDS i 0.1ml 1N HCl). Nakon prekonoćne inkubacije u cilju razgradnje nagrađenog diformazana, meren je intenzitet apsorbance, koji je direktno srazmeran produkciji ROS od strane aktiviranih PMF. Apsorbanca je određivana pomoću ELISA spektrofotometra (Behring ELISA Processor, Behring, Germany) na talasnoj dužini 570nm (referentna 650nm). Sposobnost produkcije ROS-a je određivana *ex vivo*, kao i *in vitro* nakon 24h inkubacije.

### **3.4.9. Određivanje produkcije azot oksida**

Određivanjem nivoa nitrita Griess-ovom reakcijom indirektno se vrši i određivanje količine oslobođenog azot oksida (NO). Čelije obogaćene populacije PMF su postavljene u mikrotitarsku ploču koja ima 96 bunarića u koncentraciji  $1 \times 10^5$  ćelija/bunariću bez i u prisustvu stimulatora, u četvoroplikatima. Kao stimulator je korišćen LPS u koncentraciji 100ng/ml ćelijske kulture. Nakon 24 sata inkubacije (37°C, 5% CO<sub>2</sub> po 50µl kondicioniranog medijuma iz svakog bunarića je prebačeno na novu sterilnu mikrotitarsku ploču. Potom je u svaki bunarić u kome se nalazi supernatant pažljivo dodato po 50µl smeše Griess-ovog reagensa (reagens A i reagens B u odnosu 1:1). Nakon 10 minuta inkubacija na sobnoj temperaturi, intenzitet rastvorene boje, srazmeran koncentraciji nitrita, određivan je pomoću ELISA spektrofotometra (Behring ELISA Processor, Behring, Germany) na talasnoj dužini 570nm (referentna 650nm). Na osnovu standardne krive za koncentraciju nitrita, izvršeno je preračunavanje i za ispitivane uzorke i koncentracija nitrita je izražena u µM, a predstavlja indirektnu meru količine oslobođenog NO-a.

### **3.4.10. Određivanje produkcije citokina**

Produkcija solubilnih molekula je određivana u supernatantima u kojima su obogaćeni PMF *in vitro* gajeni tokom 24 sata. Određivani su nivoi citokina IL-10 i TNF-α upotrebom komercijalnih ELISA testova po uputstvu proizvođača (eBioscience, SAD).

Mikrotitarske ploče obložene antitelima specifičnim za pacovski IL-10 ili TNF-α ostavljene su tokom noći na +4 °C radi inkubacije. Ujutru je ploča tri puta isprana puferom za ispiranje (K-PBS sa 0.05% Tween 20) u automatskom ispiraju (Anthos Fluido, ASYS, Hitech, Austria) i blokirana dodatkom 200µl rastvora koji sadrži PBS i

goveđi serum. Usledila je jednočasovna inkubacija, nakon koje je ploča na identičan način isprana. U bunariće je potom dodato po 100 $\mu$ l standarda (rekombinantni pacovski IL-10 ili TNF- $\alpha$ ) u dvostrukim opadajućim koncentracijama. Po isteku inkubacije od dva sata i ispiranja, u bunariće mikrotitarske ploče je dodato biotinom obeleženo sekundarno antitelo i ostavljeno da se inkubira sat vremena. Nakon toga, nevezana antitela su isprana, a u bunariće je dodato po 100 $\mu$ l streptavidinom konjugovanog enzima peroksidaze rena, u trajanju od 30 minuta. Kao supstrat za ovaj enzim je korišćeno po 100 $\mu$ l smeše vodonik peroksida i tetrametilbenzidina u trajanju od 15 minuta u mraku. Konačno, u finalnom koraku dodato je po 50  $\mu$ l rastvora za zaustavljanje reakcije (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Intenzitet boje je meren upotrebom ELISA spektrofotometra (Behring ELISA Processor, Behring, Germany) na talasnoj dužini 450nm. Koncentracija citokina u svakom od uzoraka je određena na osnovu standardne krive i izražavana je u pg/ml kulture.

### **3.5. STATISTIČKA ANALIZA**

Statistička analiza rezultata izvršena je pomoću IBM SPSS Statistics programa (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Svi numerički parametri su prikazani kao srednja vrednost merenja/procentat  $\pm$  standardna devijacija/standardna greška. Za opisivanje dobijenih rezultata korišćene su metode deskriptivne statistike: 1. Mere centralne tendencije (aritmetička sredina) i 2. Mere varijabiliteta (standardna devijacija ili standardna greška). U statističkoj obradi podataka za poređenje među grupama korišćena je analiza varijanse (Anova test), a za određivanje značajnosti u razlikama u ispitivanjima PMF korišćen je T-test. Verovatnoća nulte hipoteze manja od 0.05 ( $p < 0.05$ ) smatrana je statistički značajnom.



## **4. REZULTATI**

#### 4.1. DINAMIKA OPORAVKA FEMORALNOG NERVA NAKON TRANSEKCIJE I TERMINO-TERMINALNE ANASTOMOZE

Podaci prikazani u tabeli 7 ukazuju da nakon povrede motorne grane *n. femoralis-a* i njene rekonstrukcije, tokom perioda praćenja dolazi do postepene regeneracije nervnog tkiva i funkcionalnog oporavka funkcije mišića kvadricepsa.

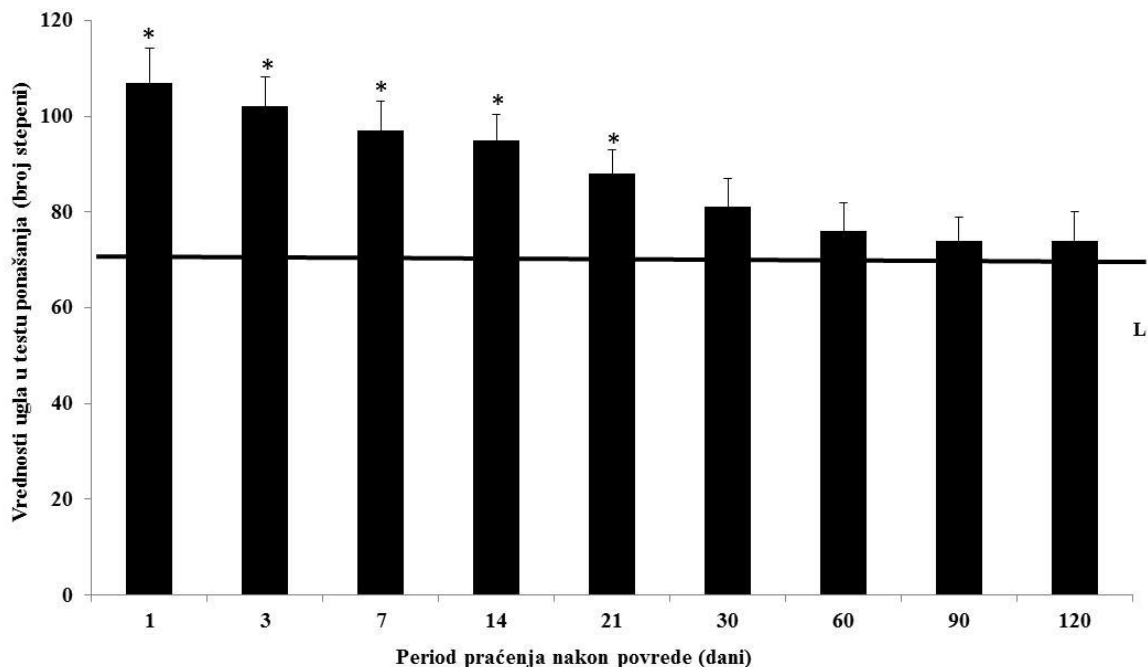
Tabela 7. Parametri oporavka mišića kvadricepsa koji ukazuju na regeneraciju motorne grane femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

Period nakon povrede (dani)	EMG aktivnost mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva u odnosu na kontralateralni (%)	Atrofija mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva u odnosu na kontralateralni (%)	Test hodanja, ugao (stepeni)
<b>1</b>	10 ± 4	0	103 ± 8
<b>3</b>	18 ± 5	0	99 ± 7
<b>7</b>	5 ± 3	0.17 ± 0.08	97 ± 8
<b>14</b>	32 ± 6	0.37 ± 0.11	95 ± 8
<b>21</b>	39 ± 7	0.38 ± 0.08	88 ± 7
<b>30</b>	59 ± 7	0.30 ± 0.09	81 ± 2
<b>60</b>	64 ± 13	0.18 ± 0.12	76 ± 3
<b>90</b>	72 ± 21	0.10 ± 0.06	74 ± 4
<b>120</b>	92 ± 38	0.16 ± 0.13	76 ± 1.4

##### 4.1.1. Funkcionalni oporavak procenjivan testom hodanja nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka

Test ponašanja je korišćen za procenu funkcionalnog stanja mišića kvadricepsa

nakon povrede motorne grane *n. femoralis* i njegove rekonstrukcije. Rezultati ovog testa dobijeni za sve ispitivane termine tokom oporavka su prikazani na grafiku 1.



Grafik 1. Vrednosti ugla izmerene korišćenjem testa hodanja u cilju procene funkcionalnog oporavka nakon povrede motorne grane femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

*Radi procene abnormalnosti hoda, meren je ugao koji formiraju zamišljena linija koja deli stopalo pacova na pola i zamišljena, horizontalna linija na površini kojom se životinja kreće, u momentu kada su prsti u fazi odvajanja od podloge. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti uglova.*

\*  $p < 0.05$  vs L

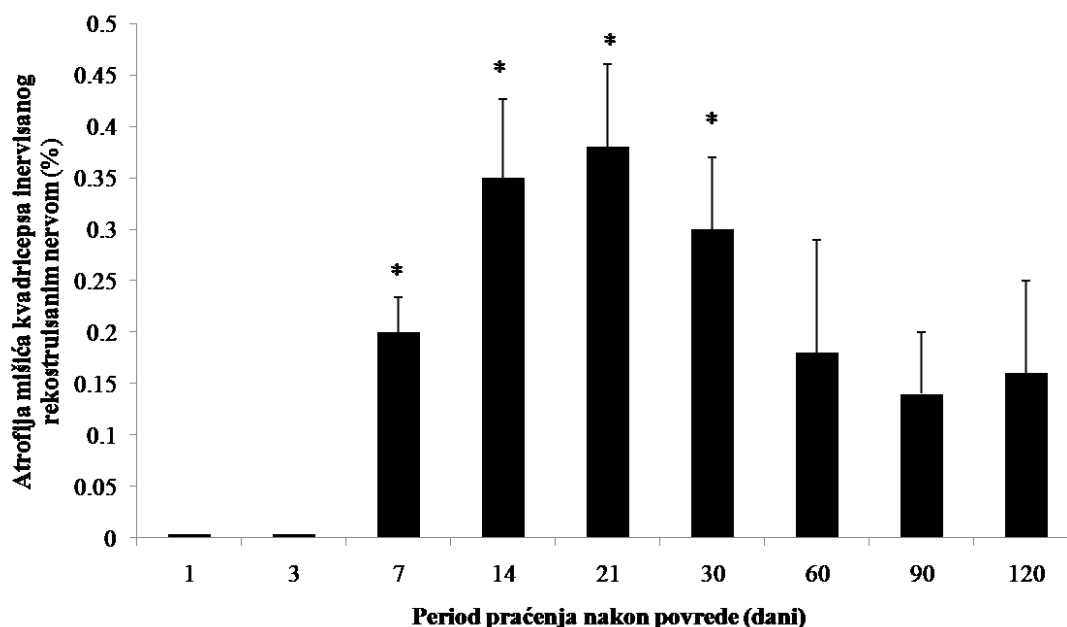
L - lažno operisane životinje (horizontalna linija), crni stubići – operisane životinje

Sa grafika 1 se uočava da vrednost ugla koji pri hodanju formira ekstremitet na kome je izvršena transekcija i rekonstrukcija motorne grane *n. femoralis-a* najveća prvog dana nakon povrede i da se tokom perioda praćenja njegova vrednost smanjuje. Vrednosti ugla koji se formira pri hodanju operisanih životinja nakon prvog, trećeg, sedmog, 14. i 21. dana od povrede su statistički značajno veće u poređenju sa vrednostima ugla koje pri hodanju formiraju lažno operisane životinje u istim

ispitivanim terminima. Kako vreme od povrede prolazi, razlika u vrednosti uglova između operisanih i lažno operisanih životinja je sve manja i nakon 30 dana od operacije ne postoji statistička značajnost.

#### 4.1.2. Atrofija mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka

Na grafiku 2 prikazan je procenat atrofije mišića inervisanih rekonstruisanom motornom granom *n. femoralis-a*.



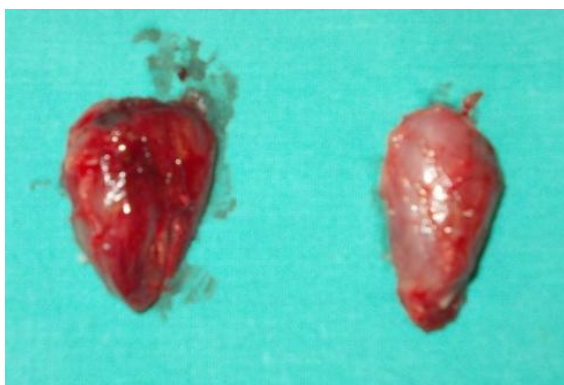
Grafik 2. Atrofija mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim nervom nakon povrede motorne grane femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka. Izmereni su mišići izolovani iz operisanog i kontralateralnog ekstremiteta. Mase mišića su prikazane kao procenat telesne atrofije ( $[(\text{masa kontralateralnog mišića} - \text{masa operisanog mišića}) / \text{ukupna telesna masa}] \times 100$ ) u odnosu na kontrolni, kontralateralni ekstremitet. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE procenta atrofije.

\*  $p < 0.05$  vs L

lažno operisane životinje (atrofija je 0%), crni stubići – operisane životinje

Sa grafika se vidi da prvog i trećeg dana nakon povrede još uvek ne postoji

razvijena detektabilna atrofija mišića kvadricepsa. Sedmog dana od povrede, procenat atrofije mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim nervom značajno raste i postaje statistički značajan u poređenju sa vrednostima dobijenim kod lažno operisanih životinja. Najveća vrednost procenta atrofije je zabeležena 21. dana nakon povrede. Nakon toga, u 30. danu opada ali je i dalje statistički značajno veća u poređenju sa lažno operisanim životinjama. Nakon 60. dana pa sve do kraja ispitivanog perioda oporavka mali stepen atrofije je prisutan ali nije statistički značajan.



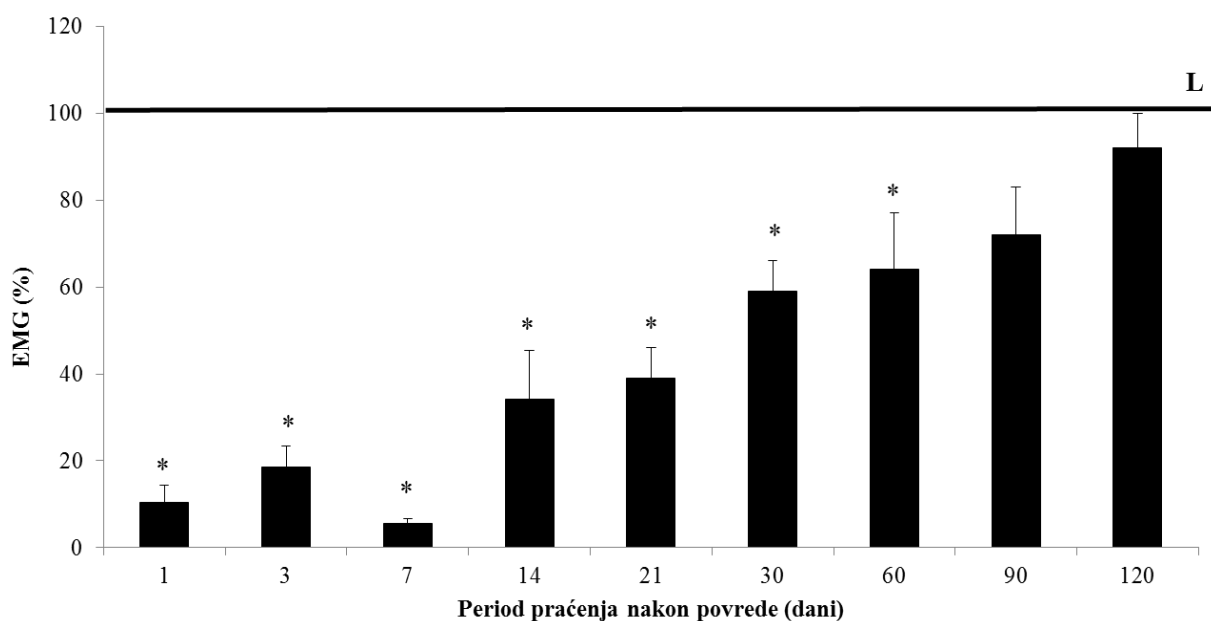
Slika 10. Mišić kvadricepsa inervisan kontralateralnim intaktnim nervom (levo) i rekonstruisanim nervom (desno) 21. dana nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva

Na slici 10 je prikazana reprezentativna fotografija mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim i kontralateralnim intaktnim nervom 21. dana oporavka. Sa ove slike se uočava značajno smanjenje veličine mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim nervom (slika 10 levo) u poređenju sa veličinom mišića inervisanog kontralateralnim intaktnim nervom (slika 10 desno).

#### **4.1.3. Elektromiografska aktivnost mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka**

Rezultati elektromiografske (EMG) procene funkcionalnog stanja mišića kvadricepsa nakon povrede motorne grane *n. femoralis-a* i njegove rekonstrukcije prikazani su na grafiku 3. Uočava se da su vrednosti izmerenog EMG-a mišića

kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva statistički značajno manje u poređenju sa vrednostima kod lažno operisanih životinja sve do 60. dana oporavka. Sa grafika se uočava da je vrednost procenta EMG-a u odnosu na kontralateralni ekstremitet niska prvog dana nakon povrede, dok trećeg dana nakon povrede pokazuje mali ali značajan rast. Sedmog dana od povrede beleži se najniža vrednost EMG-a mišića kvadricepsa. Vrednost izmerenog EMG-a raste tokom ispitivanog perioda i 120. dana iznosi preko 90% vrednosti izmerene za kontralateralni mišić.



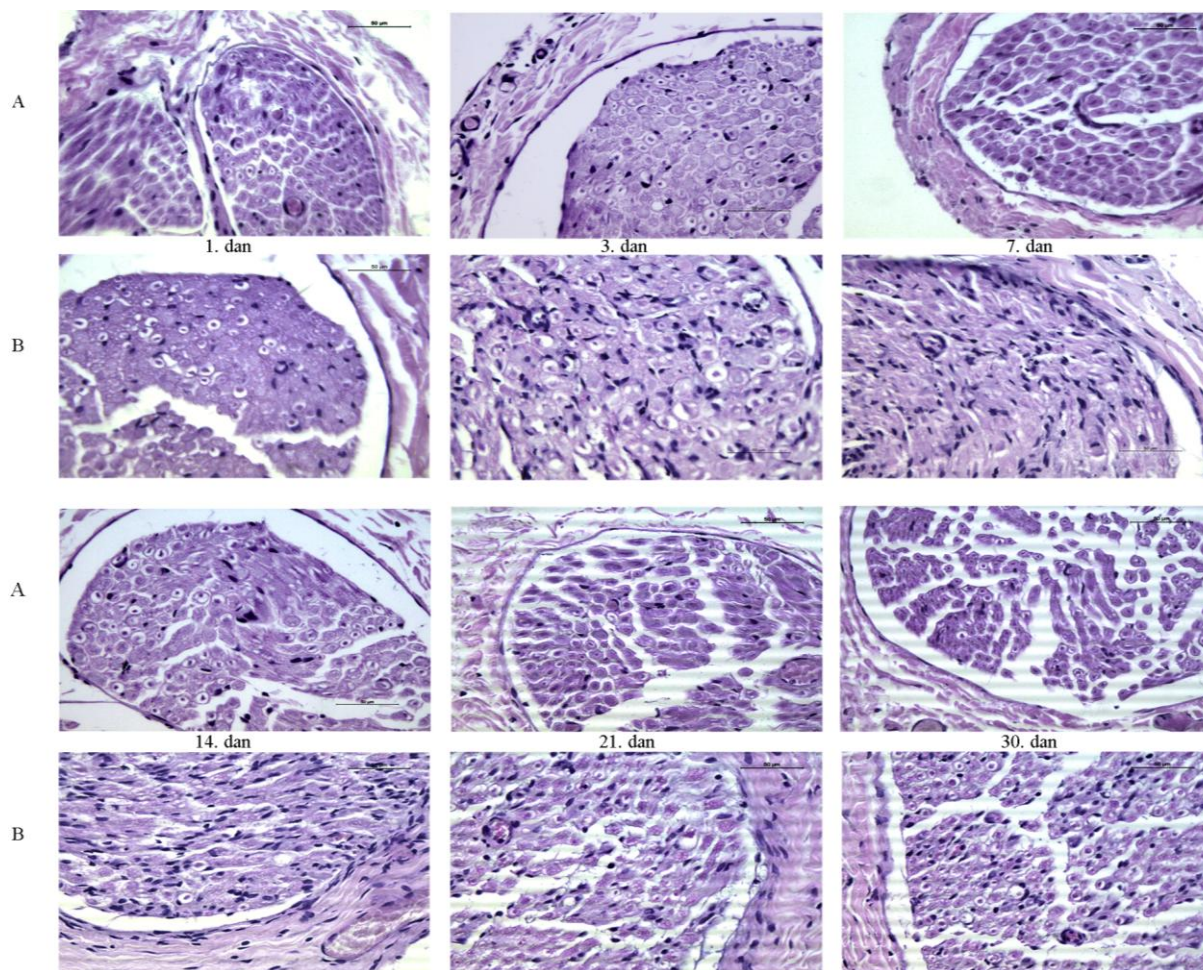
Grafik 3. EMG aktivnost mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim nervom nakon povrede motorne grane femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

*Akcioni potencijali mišića kvadricepsa su snimljeni nakon stimulisanja femoralnog nerva. Motorna grana femoralnog nerva je stimulisana proksimalno od mesta suture korišćenjem stimulatorne elektrode, dok su radi merenja oporavka mišića kvadricepsa na sam mišić postavljene monopolarne elektrode. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE procenta EMG u odnosu na kontralateralni mišić inervisan intaktnim femoralnim nervom.*

*\*  $p < 0.05$  vs L*

*L - lažni operisane životinje (horizontalna linija), crni stubići - operisane životinje.*

#### 4.1.4. Promena gustine ćelijskih jedara femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka



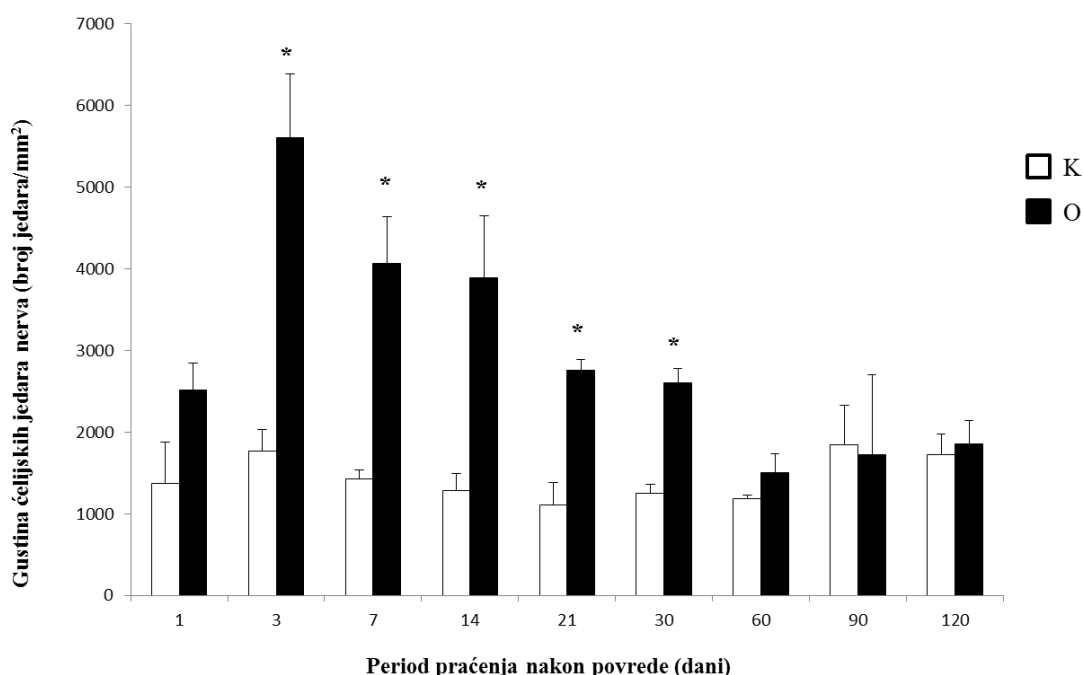
Slika 11. Svetlosne mikrofografije poprečnih preseka rekonstruisanih i kontralateralnih motornih grana femoralnih nerava operisanih životinja

*Preparati nerva su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje.*

*(A-kontralateralni nerv, B-rekonstruisani nerv).*

Na slici 11 su prikazane svetlosne mikrofografije poprečnih preseka rekonstruisanih i kontralateralnih motornih grana femoralnog nerva operisanih životinja tokom prvih 30 dana oporavka.

Sa ovih mikrografija se uočava da je gustina ćelijskih jedara u rekonstruisanim motornim granama femoralnog nerva (slike B) značajno veća u odnosu na gustinu u kontralateralnim intaktnim motornim granama nerva (slike A). Rezultati određivanja gustine ćelijskih jedara motorne grane rekonstruisanog i kontralateralnog *n. femoralis-a* u ispitivanim terminima tokom perioda oporavka su prikazani na grafiku 4. Sa grafika se može uočiti veća gustina jedara rekonstruisanog nerva u odnosu na kontralateralni u periodu od trećeg do 30. dana oporavka.



Grafik 4. Gustina ćelijskih jedara rekonstruisane i kontralateralne motorne grane *n. femoralis-a* tokom ispitivanog perioda oporavka

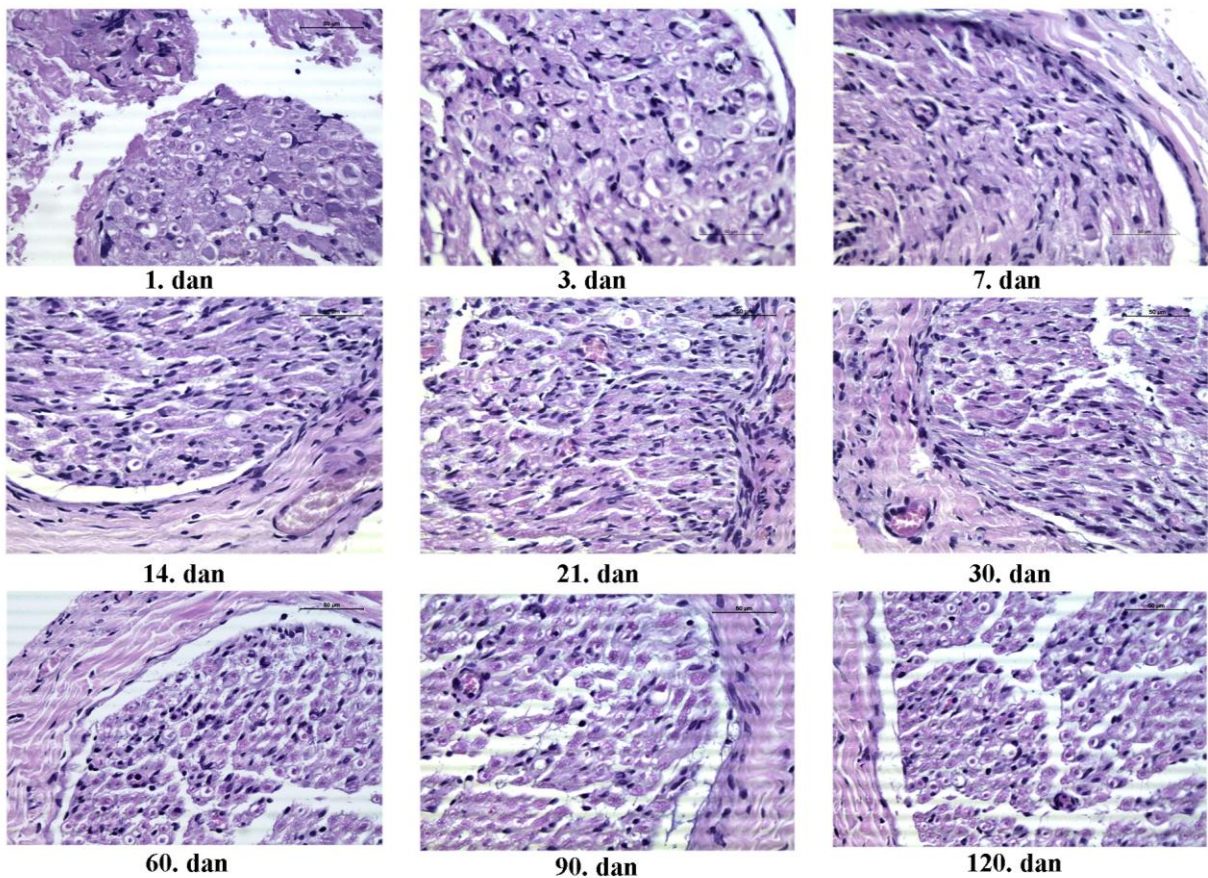
*Pripremljeni preparati poprečnih preseka nerva su posmatrani pod mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje ukupne površine preseka, nakon čega su napravljene fotografije spajane u mozaik celog preseka. Jedra su izbrojana i određena je njihova gustina (broj ćelijskih jedara/mm<sup>2</sup>). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti gustine ćelijskih jedara.*

*\* p < 0.05 vs K*

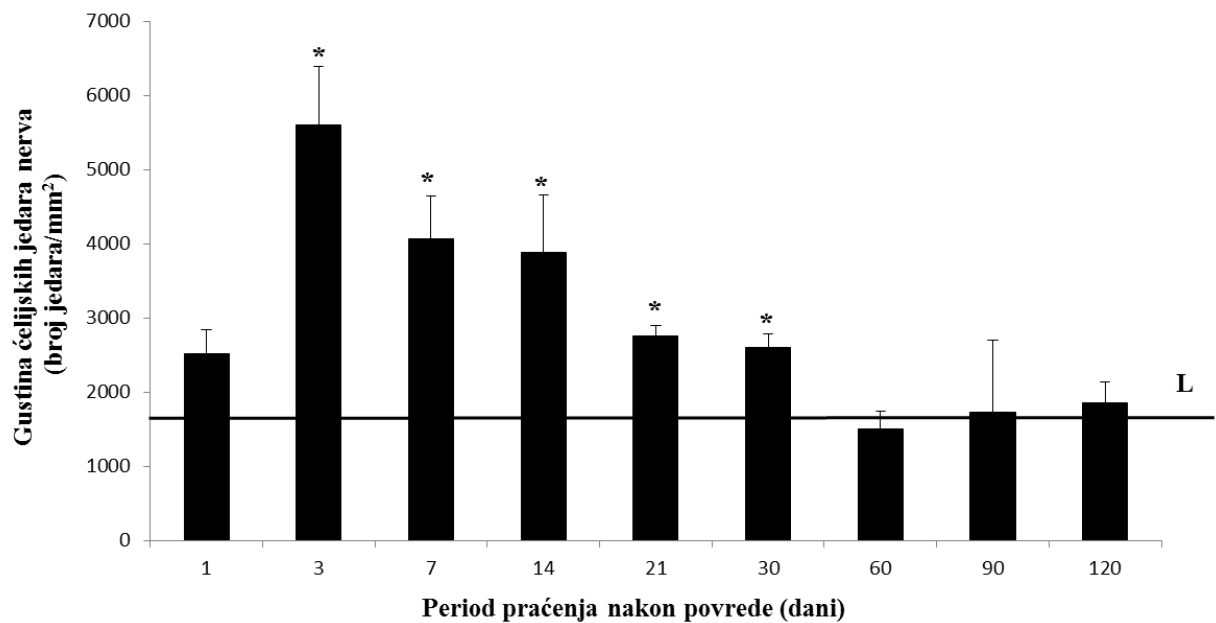
*(rekonstruisani nerv - crni stubići; kontralateralni intaktni nerv - beli stubići)*



Rezultati određivanja gustine jedara motorne grane *n. femoralis-a* nakon njene transekcije i rekonstrukcije tehnikom termino-terminalne anastamoze u ispitivanim terminima tokom perioda oporavka su prikazani na slici 12 i grafiku 5. Gustina jedara u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva je najmanja prvog dana nakon povrede. Trećeg dana nakon povrede gustina jedara dostiže maksimalnu vrednost koja u narednim danima kontinuirano opada.



Slika 12. Svetlosne mikrografije poprečnih preseka rekonstruisanih femoralnih nerava operisanih životinja tokom ispitivanog perioda oporavka  
*Preparati nerva su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje.*



Grafik 5. Gustina ćelijskih jedara u motornoj grani *n. femoralis-a* tokom ispitivanog perioda oporavka

*Pripremljeni preparati poprečnih preseka nerva su posmatrani pod mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje ukupne površine preseka, nakon čega su napravljene fotografije spajane u mozaik celog preseka. Jedra su izbrojana i određena je njihova gustina (broj ćelijskih jedara/mm<sup>2</sup>). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti gustine ćelijskih jedara.*

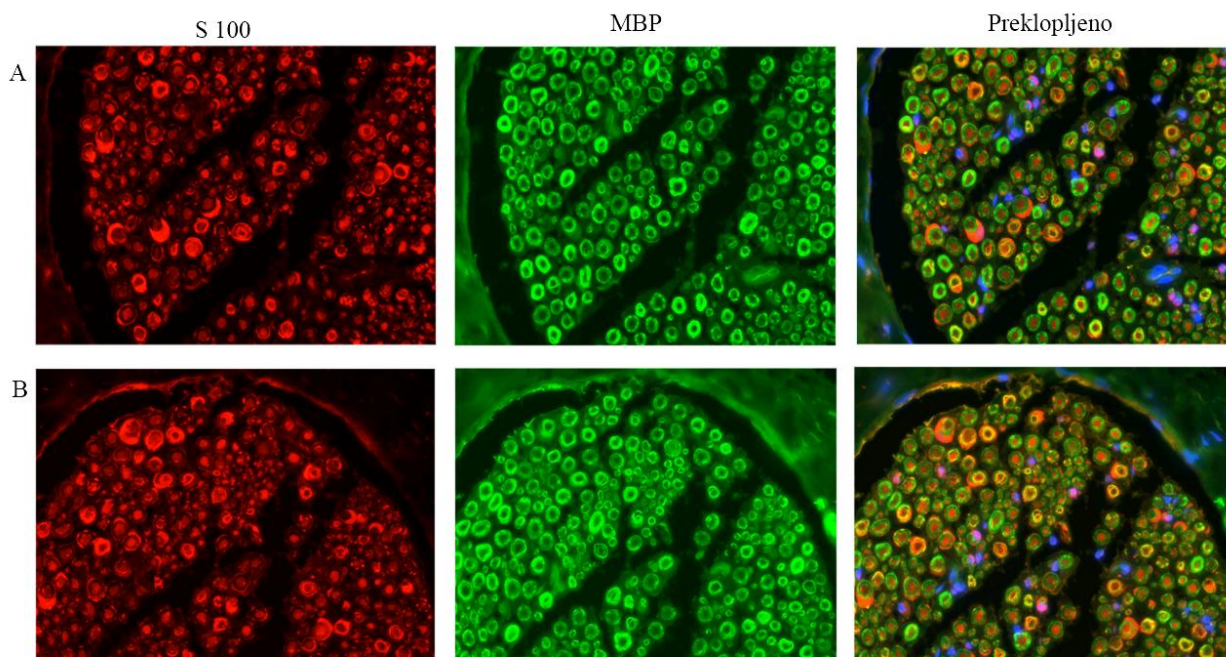
*\*  $p < 0.05$  vs L*

*O – rekonstruisani nerv, L – intaktni nerv lažno operisanih životinja*

#### **4.1.5. Prisustvo Švanovih ćelija u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze tokom perioda oporavka**

Na slici 13 je prikazana ekspresija S100 proteina markera Švanovih ćelija i MBP proteina na osnovu kog se procenjuje struktura mijelinskog omotača u motornoj grani femoralnog nerva lažno operisanih životinja (slika 13 A) i kontralateralnom intaktnom nervu operisanih životinja (slika 13 B). Na osnovu detektovane imunoreaktivnosti može se reći da ne postoje razlike u broju Švanovih ćelija i strukturi mijelinskog omotača između motorne grane femoralnog nerva lažno operisanih životinja i motorne grane

kontralateralnog intaktnog nerva operisanih životinja. U oba slučaja se uočava očuvana struktura nerva.

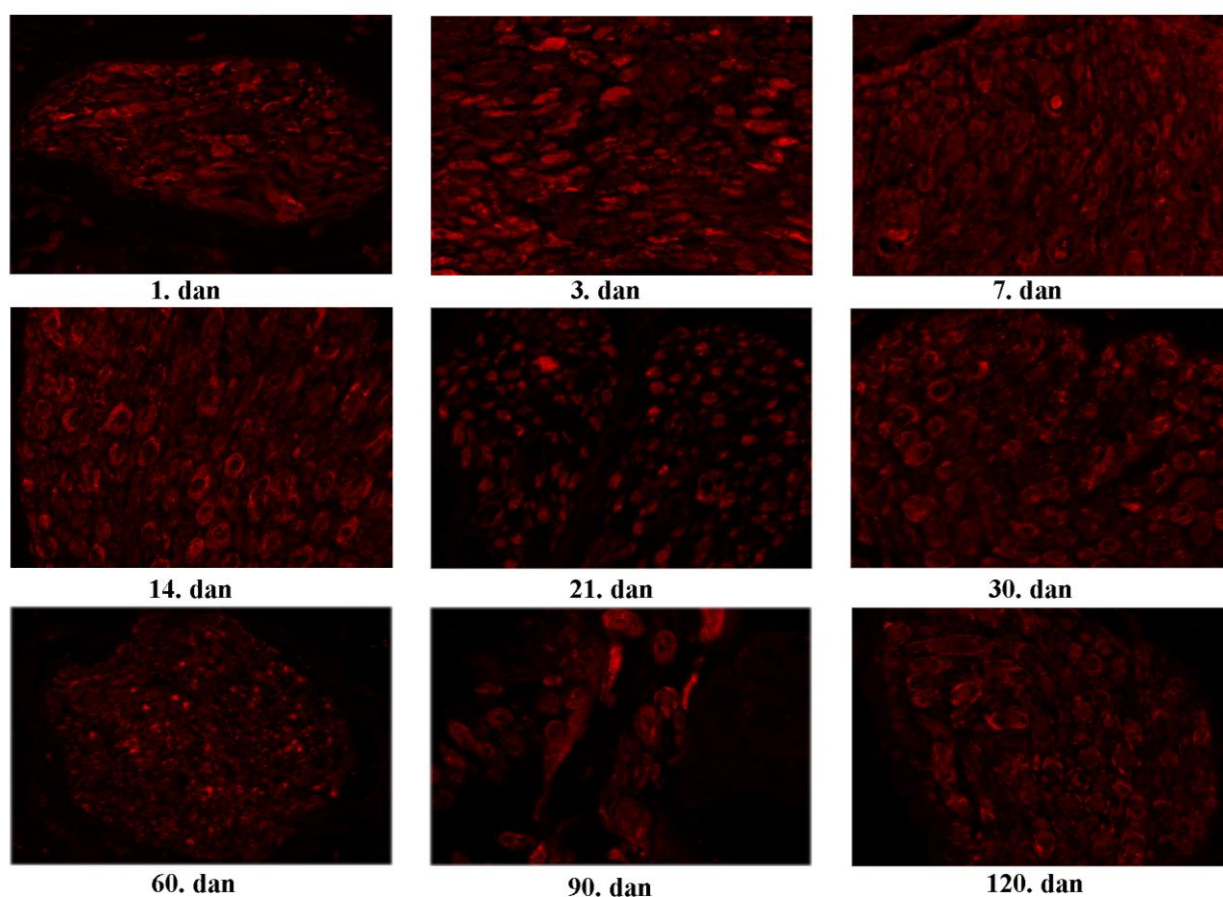


Slika 13. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje S100 (crveno) i mijelin baznog proteina (zeleno) u motornoj grani femoralnog nerva lažno operisanih životinja (A) i kontralateralnom intaktnom nervu operisanih životinja (B)

*U cilju detekcije prisustva Švanovih ćelija i promena u mijelinskom omotaču korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifičnim za S100 i MBP. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka motorne grane n. femoralis-a operisanih životinja. Uvećanje 40x.*

Na slici 14 je detekcijom ekspresije S100 proteina imunohistohemijskom tehnikom prikazana dinamika prisustva Švanovih ćelija u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka. Sa slike se uočava da je prvog dana oporavka prisutan obrazac imunoreaktivnosti sličan onom kod lažno operisanih životinja (slika 13 A), kao i u kontralateralnoj intaktnoj motornoj grani n. femoralis-a (slika 13 B). Treći postoperativni dan karakteriše pojačana imunoreaktivnost za S100 protein, kao i promenjena morfologija Švanovih ćelija što sve ukazuje na prisustvo većeg broja dediferenciranih Švanovih ćelija. U sedmom danu

oporavka je prisutan sličan obrazac imunoreaktivnosti kao i u trećem danu. Srpasta morfologija Švanovih ćelija koja je odlika mijelinizirajućih ćelija se ponovo uočava u 14. danu nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane *n. femoralis*-a. Nakon 21. dana pa sve do kraja posmatranog perioda oporavka (120. dan) imunoreaktivnost za S100 je slična imunoreaktivnosti kod lažno operisanih životinja i kontralateralnoj intaktnoj motornoj grani femoralnog nerva (slika 13 A, B).



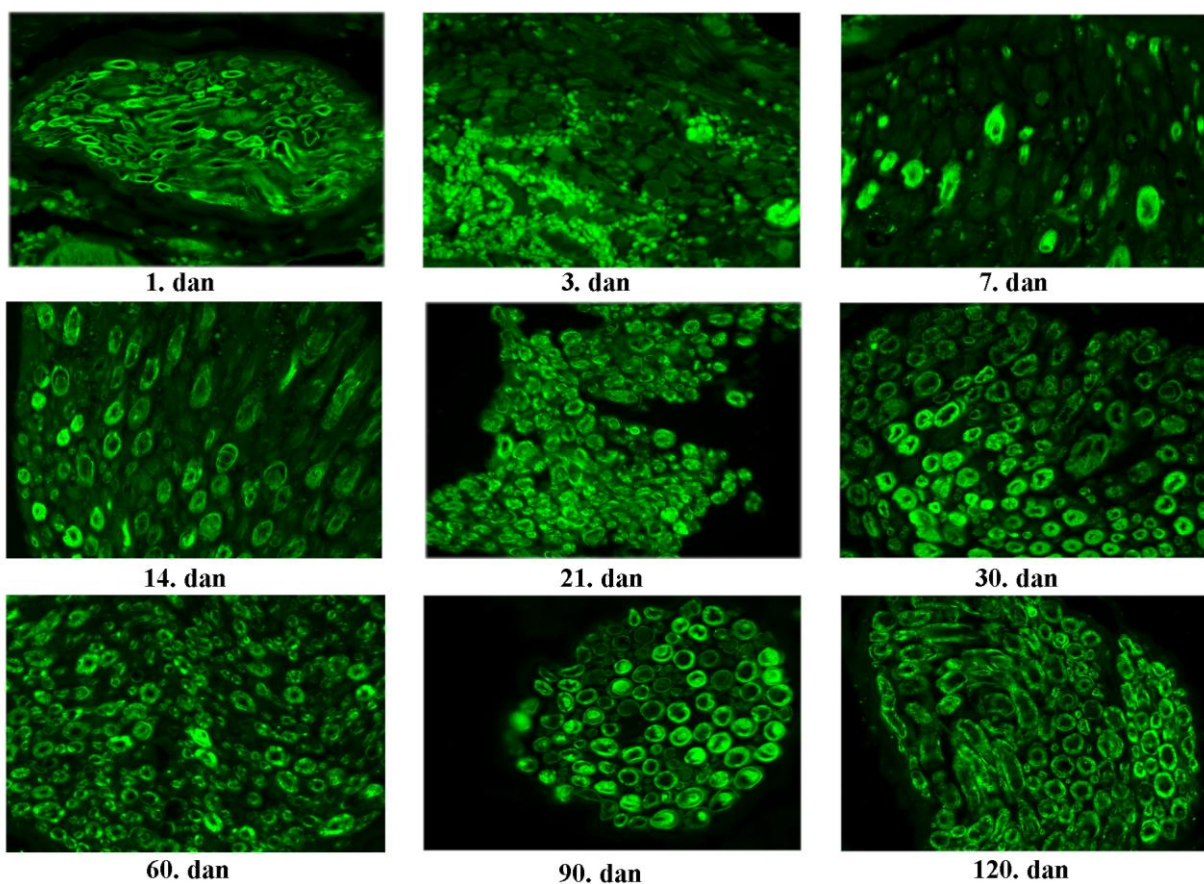
Slika 14. Prisustvo Švanovih ćelija u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

*U cilju detekcije prisustva Švanovih ćelija korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane *n. femoralis*-a antitelima specifičnim za S100 protein. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka rekonstruisane motorne grane *n. femoralis*-a operisanih životinja.*

*Uvećanje 40x.*

#### 4.1.6. Prisustvo mijelin baznog proteina u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze tokom perioda oporavka

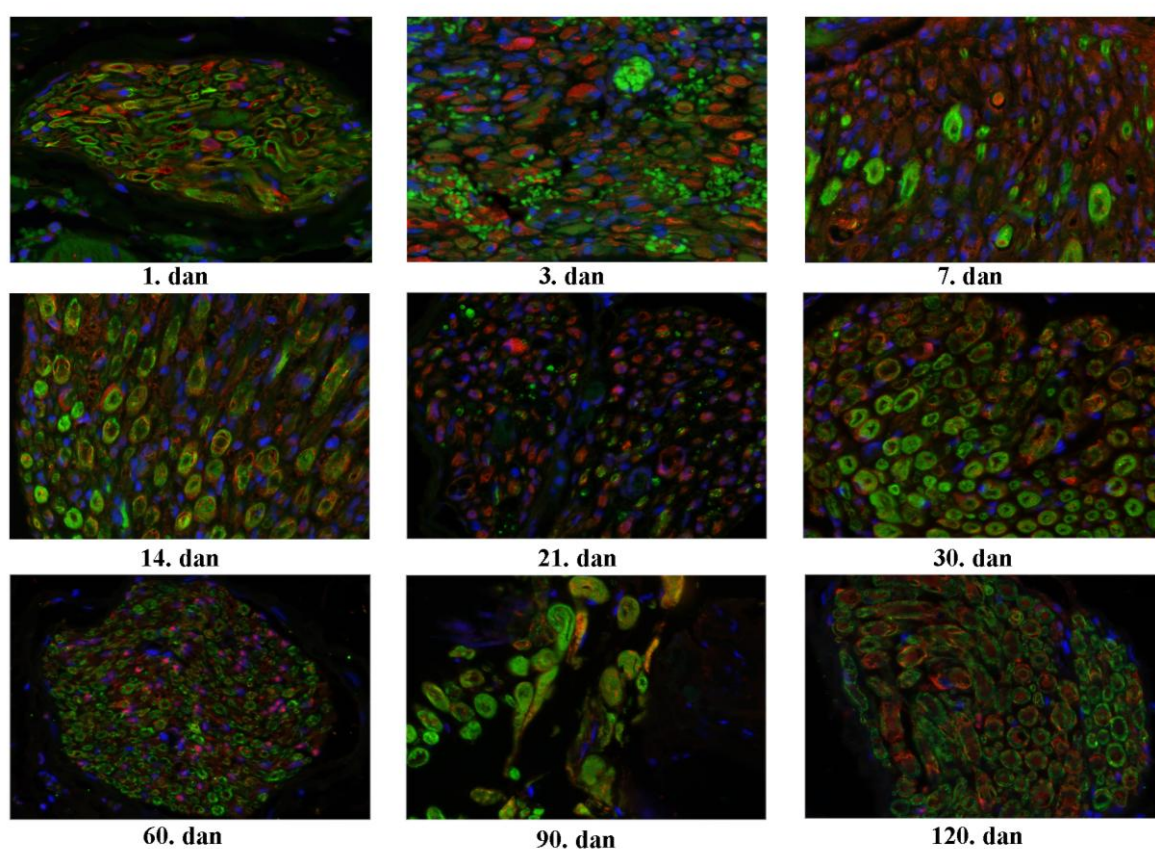
Za procenu stanja mijelinskog omotača nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane *n. femoralis*-a korišćeno je imunofluorescentno bojenje za MBP. Rezultati ovog bojenja su prikazani na slici 15.



Slika 15. Prisustvo mijelin baznog proteina u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

*U cilju detekcije promena u mijelinskom omotaču korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifičnim za MBP. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a operisanih životinja. Uvećanje 40x.*

Imunoreaktivnost za MBP zabeležena prvog dana oporavka ukazuje na još uvek očuvanu strukturu aksona i mijelinskog omotača. S druge strane, trećeg dana oporavka prisutna je imunoreaktivnost u obliku tačkastih nakupina što odgovara razgrađenom mijelinu. Obrazac imunske reakcije se menja u sedmom danu kada se uočava intenzivno bojenje oko pojedinačnih aksona. Nakon 14 dana od transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva i dalje se povećava imunoreaktivnost za MBP. Od 21. dana do kraja praćenja oporavka (120. dan) imunoreaktivnost se ujednačava, povećana je debljina mijelinskog omotača koja je slična onoj detektovanoj na nervima lažno operisanih životinja i kontralateralnom intaktnom nervu (slika 13A,B).



Slika 16. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje S100 (crveno) i mijelin baznog proteina (zeleno) u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

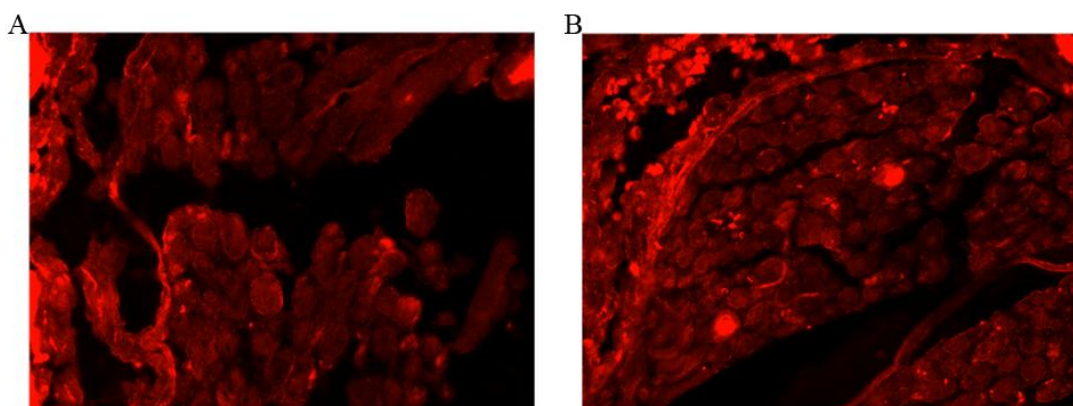
*U cilju istovremene detekcije promena u mijelinskom omotaču i prisustva Švanovih ćelija korišćeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifičnim za MBP i S100. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka rekonstruisane*

*motorne grane n. femoralis-a operisanih životinja. Uvećanje 40x.*

Na slici 16 je prikazano dvojno bojenje za S100 (crveno) i MBP (zeleno). Sa ovih reprezentativnih slika se u svim ispitivanim vremenskim tačkama oporavka uočava kolokalizacija S100 i MBP-a osim u trećem danu gde se uočavaju samo dediferencirane Švanove ćelije i ostaci razgrađenog mijelina.

#### **4.1.7. Izrastanje aksona u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze tokom perioda oporavka**

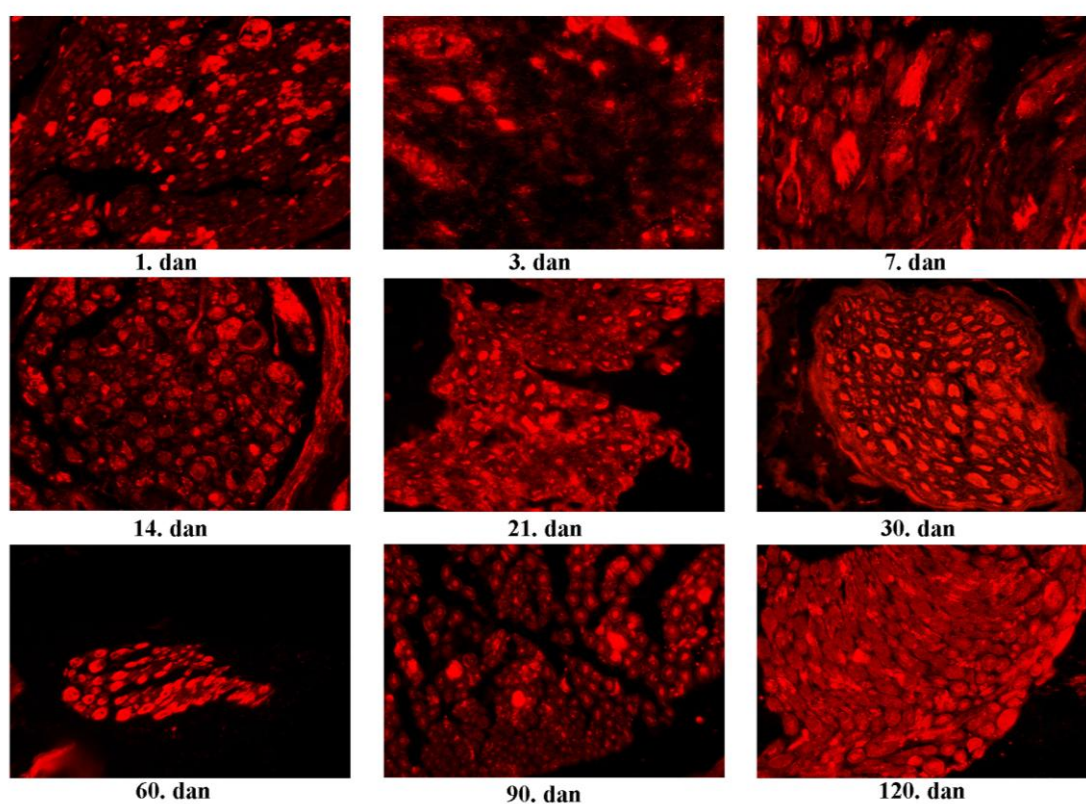
U motornoj grani kontrolnog femoralnog nerva lažno operisanih životinja imunoreaktivnost za GAP-43 se skoro ne uočava (slika 17 A). Kod operisanih životinja u motornoj grani kontralateralnog femoralnog nerva (slika 17 B) nije uočena razlika u imunoreaktivnosti za GAP-43 u odnosu na lažno operisane životinje (slika 17 A).



Slika 17. Imunofluorescentno obeležavanje GAP-43 u motornoj grani femoralnog nerva lažno operisanih životinja (A) i kontralateralnom intaktnom nervu operisanih životinja (B)

*U cilju detekcije oporavka i rasta aksona korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifičnim za GAP-43. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a operisanih životinja. Uvećanje 40x.*

Za procenu rasta aksona tokom ispitivanog perioda oporavka praćena je ekspresija GAP-43 kao markera rasta aksona (slika 18). U prvom danu se još uvek uoćava normalan obrazac imunoreaktivnosti za GAP-43 slićan onom koji se detektuje u nervima lažno operisanih ųivotinja (slika 17 A) i u intaktnom kontralateralnom nervu operisanih ųivotinja (slika 17 B). U periodu od trećeg do 14. dana je smanjena imunoreaktivnost za GAP-43, nakon ćega se uoćava izuzetno povećanje rasta aksona gde se u 30. danu uoćava veći broj sitnijih i manji broj krupnijih aksona. Nasuprot tome, u 90. i 120. danu se uoćava smanjen broj aksona manjeg dijametra u korist aksona većeg dijametra.

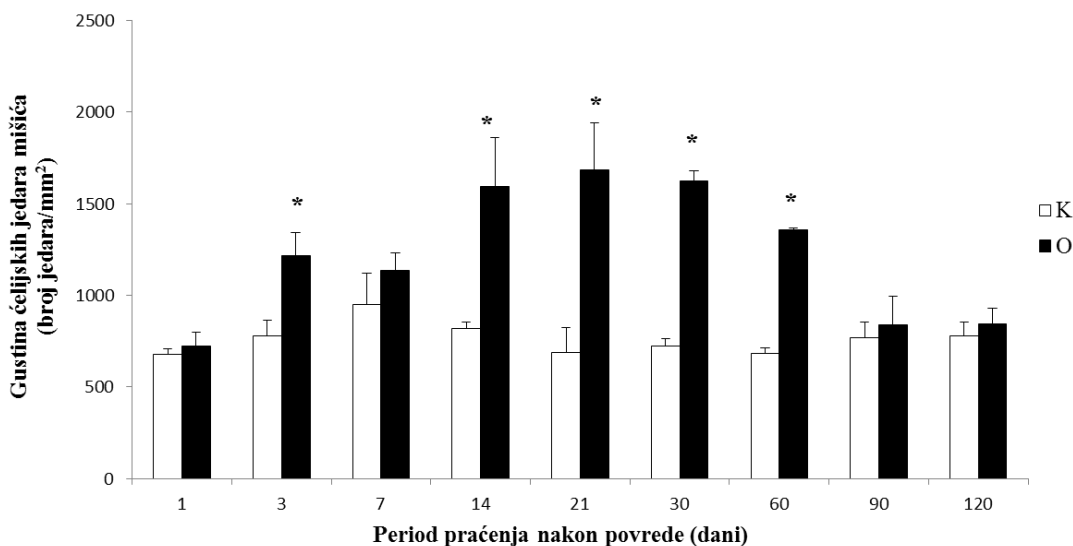


Slika 18. Imunofluorescentno obeleųavanje GAP-43 u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka  
*U cilju detekcije oporavka i rasta aksona korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprećnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifićnim za GAP-43. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprećnih preseka rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a operisanih ųivotinja. Uvećanje 40x.*



#### 4.1.8. Gustina ćelijskih jedara mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka

Rezultati određivanja gustine jedara mišića kvadricepsa nakon povrede motorne grane *n. femoralis* i njene rekonstrukcije u poređenju sa dobijenim rezultatima u kontralateralnom nervu prikazani su na grafiku 6. Sa grafika se uočava da prvog dana nakon povrede nisu detektovane razlike u gustini ćelijskih jedara. Potom gustina jedara u mišiću inervisanom rekonstruisanim nervom u odnosu na kontralateralni mišić inervisan intaktnim nervom raste i u periodu od trećeg do 60. dana oporavka je statistički značajno veća. U 90. i 120. danu oporavka razlike se više ne detektuju.



Grafik 6. Gustina ćelijskih jedara mišića kvadricepsa inervisanih rekonstruisanom i kontralateralnom motornom granom *n. femoralis-a* tokom ispitivanog perioda oporavka

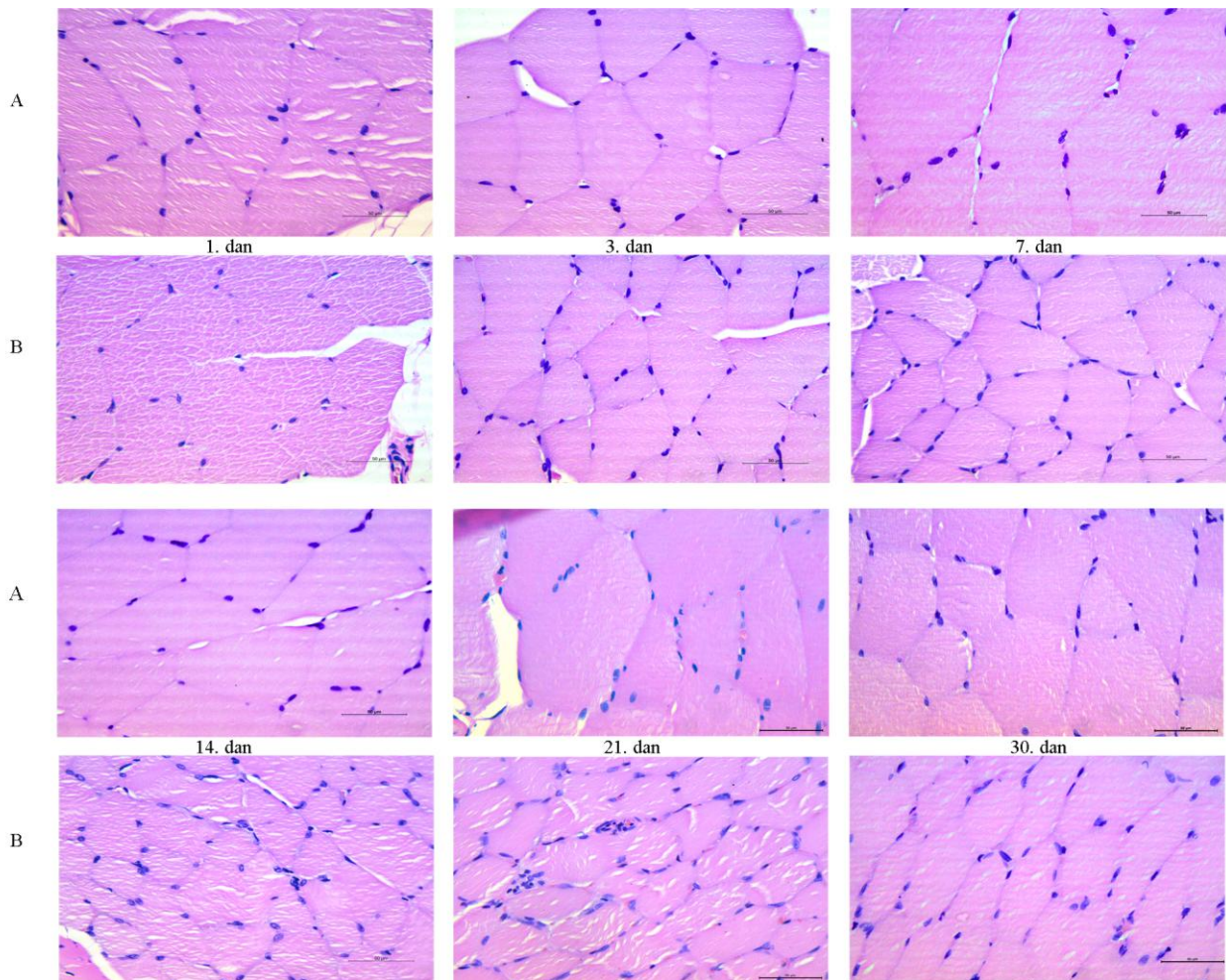
*Pripremljeni preparati poprečnih preseka mišića kvadricepsa su posmatrani pod mikroskopom i slikani pri uvećanju od 40 puta. Pravljeno je 20 fotografija različitih regiona preseka. Jedra su izbrojana i određena je njihova gustina (broj jedara/mm<sup>2</sup>).*

*Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti gustine jedara.*

*\* p < 0.05 vs K*

*O – mišić inervisan rekonstruisanim nervom, K – kontralateralni mišić inervisan intaktnim nervom*

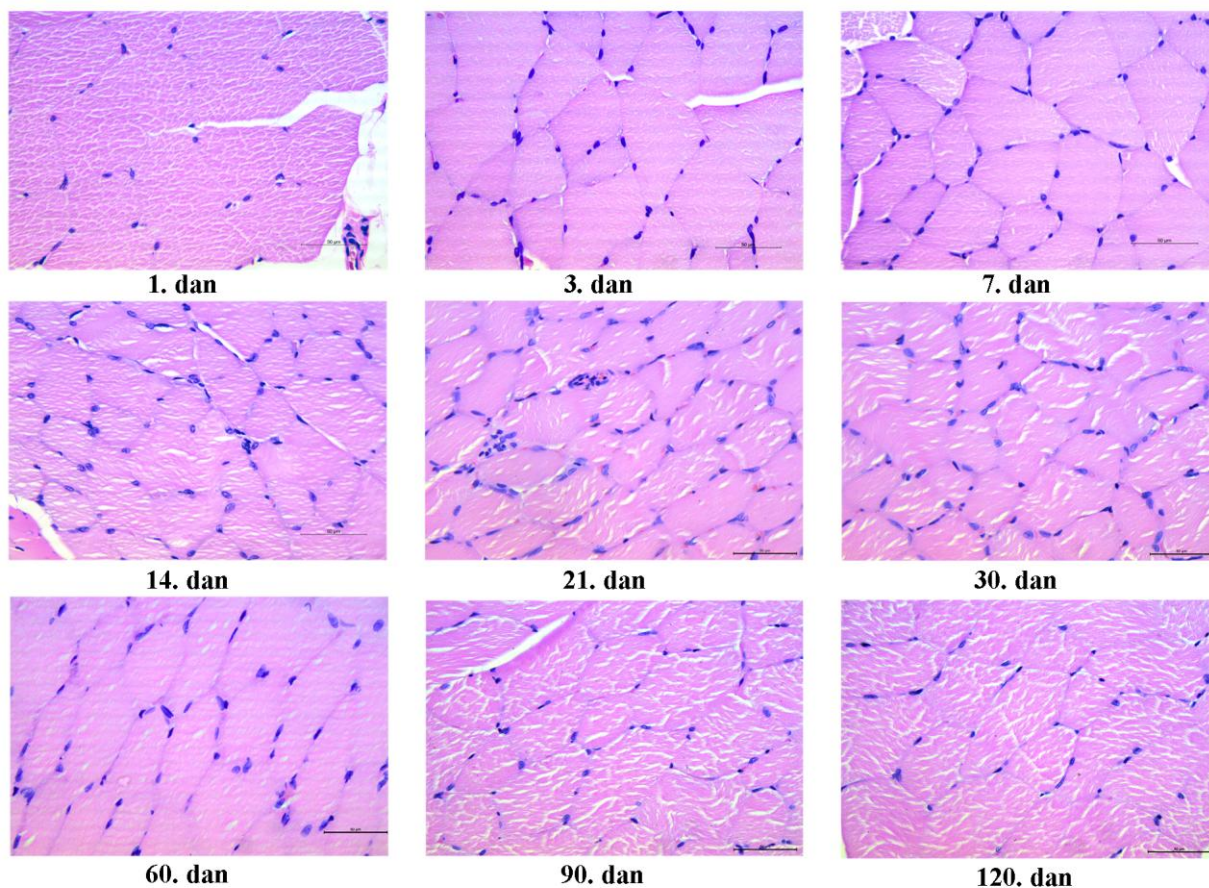
Na slici 19 su prikazane reprezentativne svetlosne mikrografije poprečnih preseka mišića kvadricepsa inervisanih rekonstruisanim i kontralateralnim motornim granama femoralnog nerva operisanih životinja tokom prvih mesec dana oporavka se kojih se jasno vidi povećanje gustine ćelijskih jedara prisutnih u mišiću inervisanim rekonstruisanim motornom granom femoralnog nerva.



Slika 19. Svetlosne mikrografije poprečnih preseka mišića kvadricepsa inervisanih rekonstruisanim i kontralateralnim motornim granama femoralnog nerva operisanih životinja

*Preparati mišića su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje.*

*(A-kontralateralni mišić, B-mišić invisan rekonstruisanim nervom).*

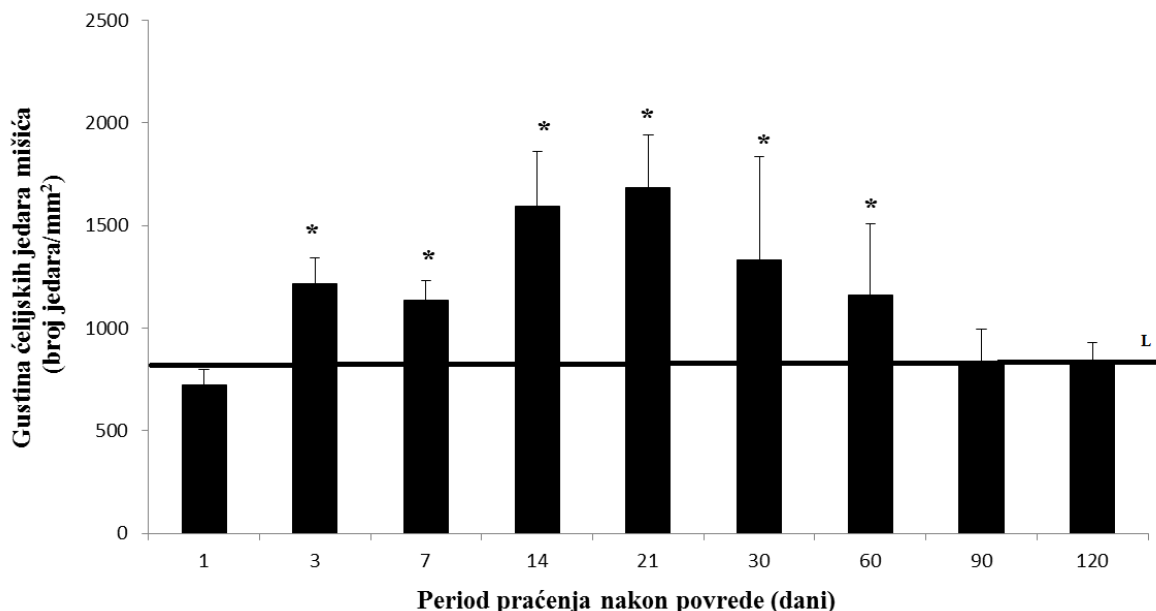


Slika 20. Svetlosne mikrografije poprečnih preseka mišića kvadricepsa inervisanih rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva operisanih životinja tokom ispitivanog perioda oporavka

*Preparati mišića su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje.*

Reprezentativne svetlosne mikrografije poprečnih preseka mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva tokom prvih mesec dana oporavka (slika 20). Sa ovih mikrografija se uočava od trećeg do 60. dana oporavka povećana gustina ćelijskih jedara. Kvantifikovani rezultati gustine ćelijskih jedara mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva su prikazani na grafiku 7. Rezultati prikazani na ovom grafiku jasno govore o statistički značajno većoj gustini ćelijskih jedara u mišiću inervisanom rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva u poređenju sa istom kod lažno operisanih

životinja u periodu od trećeg do 60. dana oporavka. U 90. i 120. danu oporavka zabeležena je približno ista gustina ćelijskih jedara kao i kod lažno operisanih životinja.



Grafik 7. Gustina ćelijskih jedara mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom *n. femoralis-a* tokom ispitivanog perioda oporavka  
 Pripremljeni preparati poprečnih preseka mišića kvadricepsa su posmatrani pod mikroskopom i slikani pri uvećanju od 40 puta. Pravljeni su 20 fotografija različitih regiona preseka. Jedra su izbrojana i određena je njihova gustina (broj jedara/mm<sup>2</sup>).  
 Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti gustine jedara.

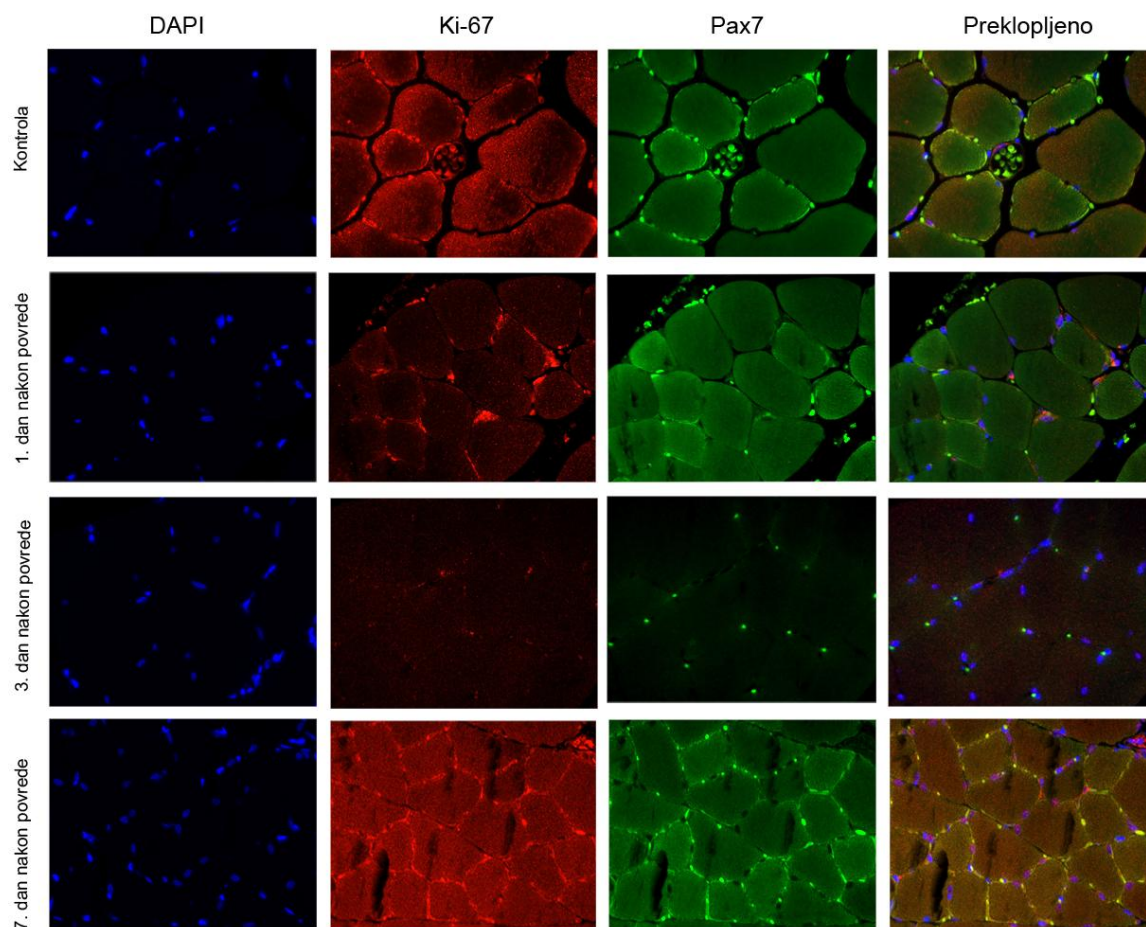
\*  $p < 0.05$  vs L

O – rekonstruisani nerv, L – intaktni nerv lažno operisanih životinja

#### 4.1.9. Prisustvo satelitskih ćelija u mišiću kvadricepsu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka

Na slikama 21, 22 i 23 je prikazana promena u broju satelitskih ćelija praćena kombinacijom Ki-67, markera proliferacije, i Pax7 i VCAM-1 molekula u mišiću kvadricepsu inervisanom rekonstruisanom motornom granom *n. femoralis-a* praćenog

perioda oporavka.

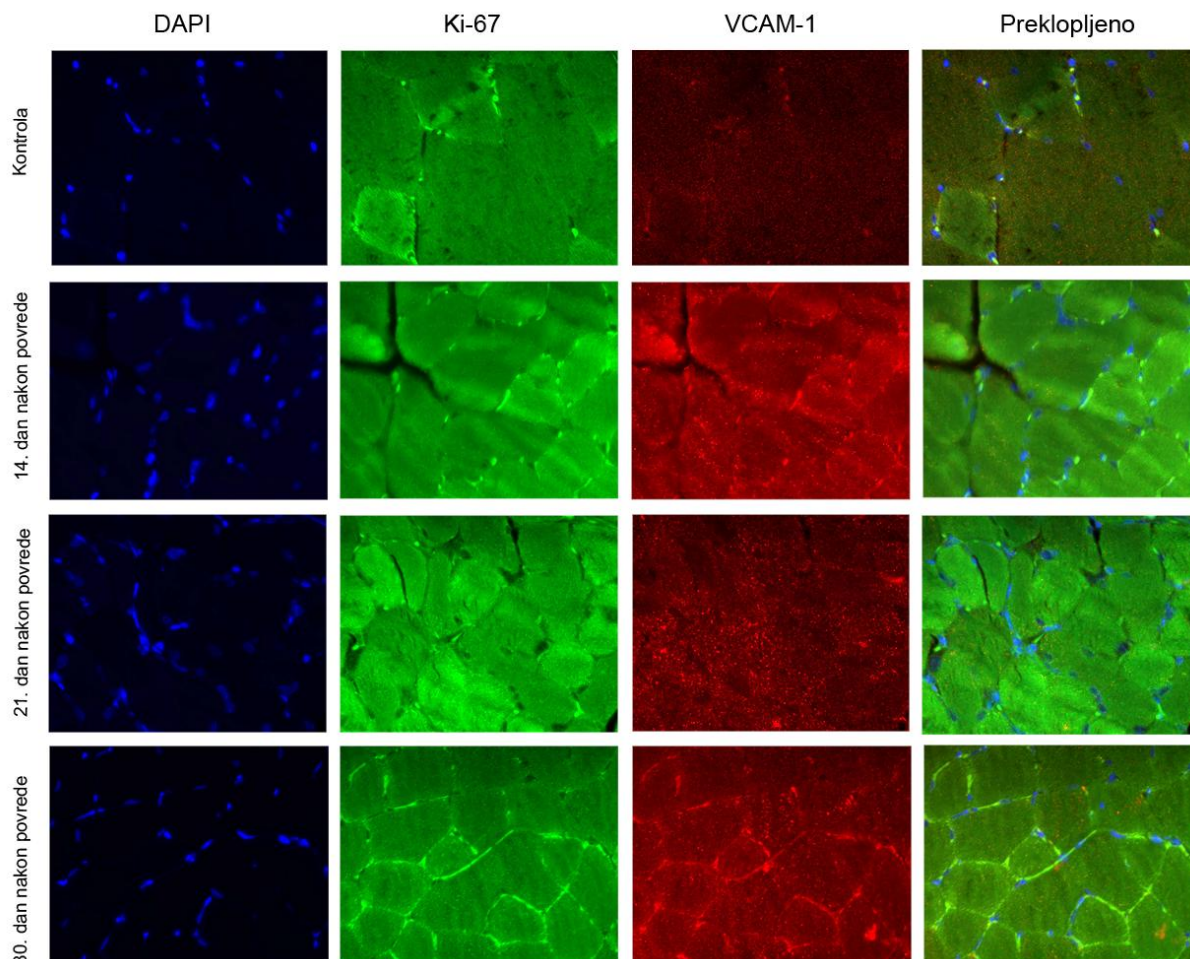


Slika 21. Ekspresija Pax7 (zeleno) i Ki-67 (crveno) u mišiću kvadricepsu inervisanom rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva operisanih životinja tokom prvih sedam dana oporavka

*U cilju detekcije prisustva satelitskih ćelija korišćeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom n. femoralis-a antitelima specifičnim za Pax-7 i Ki67. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka mišića kvadricepsa. Uvećanje 40x.*

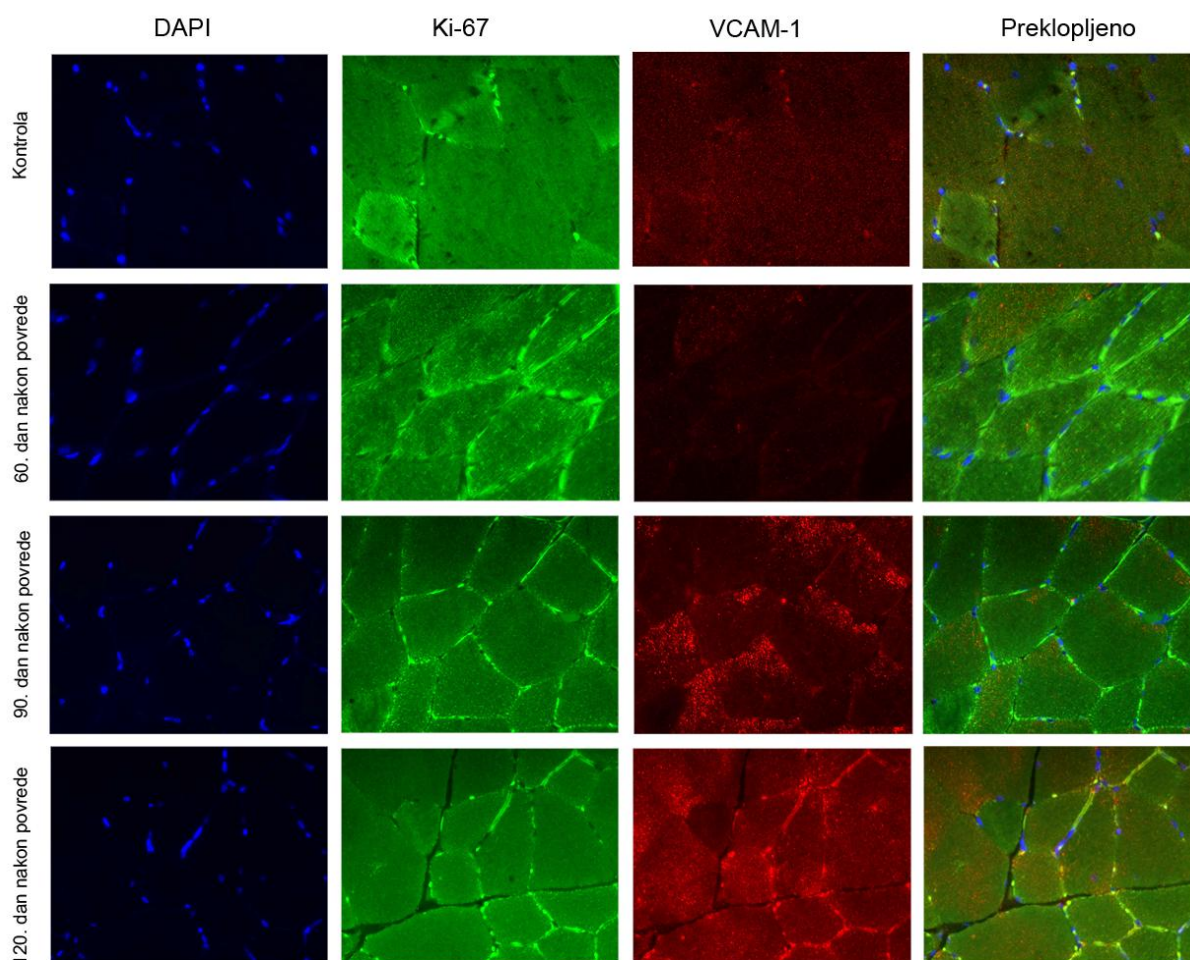
Na slici 21 se uočava da do trećeg dana nema velikih promena u broju satelitskih ćelija. U sedmom danu se uočava veliko povećanje broja satelitskih ćelija. S obzirom da postoji apsolutno preklapanje ekspresije Pax7 molekula i Ki-67 (žuta fluorescencija na preklopljenoj slici 21) može se zaključiti da su ćelije koje proliferišu satelitske ćelije.

Ovaj trend se nastavlja i u periodu od 14. do 120. dana oporavka što je prikazano na slikama 22 i 23.



Slika 22. Ekspresija VCAM-1 (crveno) i Ki-67 (zeleno) u mišiću kvadricepsu inervisanom rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva operisanih životinja u periodu od 14. do 30. dana oporavka

*U cilju detekcije prisustva satelitskih ćelija korišćeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom n. femoralis-a antitelima specifičnim za VCAM-1 i Ki-67. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka mišića kvadricepsa. Uvećanje 40x.*



Slika 23. Ekspresija VCAM-1 (crveno) i Ki-67 (zeleno) u mišiću kvadricepsu inervisanom rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva operisanih životinja u periodu od 60. do 120. dana oporavka

*U cilju detekcije prisustva satelitskih ćelija korišćeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanom motornom granom n. femoralis-a antitelima specifičnim za VCAM-1 i Ki67. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka mišića kvadricepsa. Uvećanje 40x.*

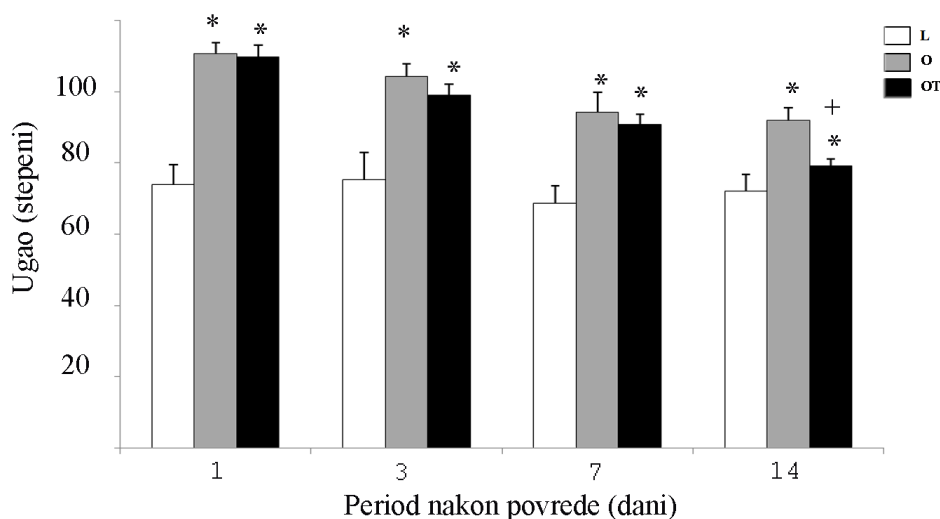
#### **4.2. EFEEKAT TERAPIJE VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA OPORAVAK FEMORALNOG NERVA**

Drugi deo doktorske teze se odnosio na ispitivanje efekata terapije vitaminima B

kompleksa na funkcionalni oporavak mišića kvadricepsa nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane n. femoralis-a i ćelijske procese koji se dešavaju u povređenom nervu i mišiću inervisanom rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva.

#### 4.2.1. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na funkcionalni oporavak procenjivan testom hodanja nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva

Na grafiku 8 su prikazane vrednosti uglova koje pri hodanju formiraju ekstremiteti čiji je mišić kvadriceps inervisan rekonstruisanim n. femoralis-om netretiranih i kompleksom vitamina B tretiranih životinja.



Grafik 8. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na vrednosti ugla izmerene korišćenjem testa hodanja u cilju procene funkcionalnog oporavka nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva

Radi procene abnormalnosti hoda, meren je ugao koji formiraju zamišljena linija koja deli stopalo pacova na pola i zamišljena, horizontalna linija na površini kojom se životinja kreće, u momentu kada su prsti u fazi odvajanja od podloge. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti uglova.

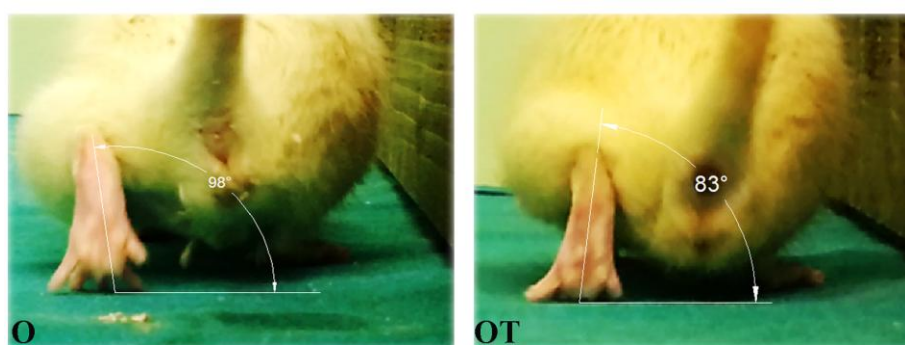
\*  $p < 0.05$  vs L

+  $p < 0.05$  vs O



*L - lažno operisane životinje, O – operisane životinje, OT – operisane i tretirane životinje*

Kod obe grupe životinja sa povređenim nervom, operisane, netretirane (O) i operisane, tretirane (OT), uočava se značajno povećanje vrednosti uglova neposredno nakon povrede kao i postepeni oporavak tokom vremena. Najveće vrednosti ugla su primećene prvog dana nakon povrede ( $110.7 \pm 3.1$  i  $109.8 \pm 3.4$  stepeni za operisanu, netretiranu i operisanu, tretiranu grupu). Razlika u vrednostima ugla između obe grupe operisanih životinja u odnosu na grupu lažno operisanih životinja (L) je bila visoko statistički značajna ( $74.0 \pm 5.6$  stepeni) bez značajne razlike između O i OT grupa. Kod obe grupe operisanih životinja primećeno je smanjenje vrednosti ugla tokom vremena (treći i sedmi postoperativni dan) sa značajnim razlikama između O ( $104.2 \pm 3.6$  za treći i  $94.3 \pm 5.5$  za sedmi dan) i OT grupa ( $99.0 \pm 3.2$  za treći ,odnosno  $90.9 \pm 2.8$  za sedmi dan) u odnosu na lažno operisane ( $75.3 \pm 7.6$  za treći i  $68.7 \pm 5.0$  za sedmi dan). Razlike između O i OT grupa se i dalje bile bez statističke značajnosti. Međutim, 14 dana nakon povrede uočena je statistički značajna razlika u vrednostima ugla između O i OT grupa ( $91.9 \pm 3.6$  i  $79.1 \pm 2.2$ ). Efekat terapije na smanjenje ugla koji povređeni ekstremitet formira je prikazan i na slici 24.

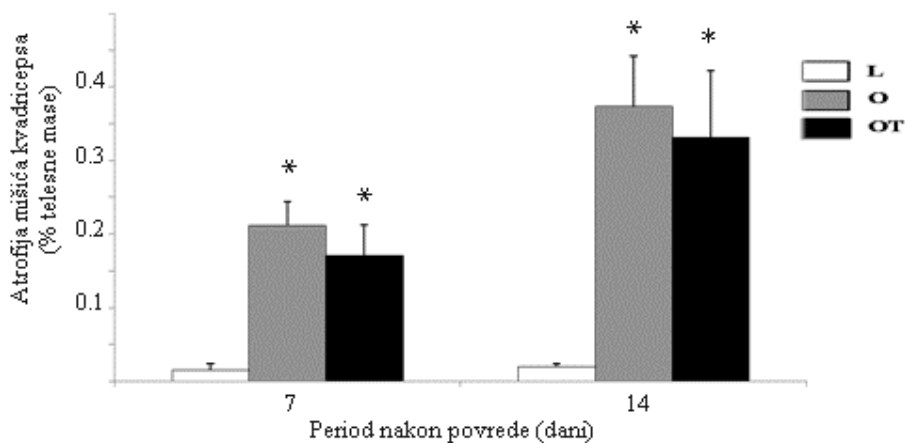


14. dana nakon povrede

Slika 24. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na funkcionalni oporavak nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva  
*Fotografije unutrašnje rotacije stopala povređenog ekstremiteta O i OT životinja*  
*O – operisane životinje, OT – operisane i tretirane životinje*

#### 4.2.2. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na atrofiju mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva

Na grafiku 9 prikazan je efekat terapije vitaminima B kompleksa na atrofiju mišića kvadricepsa nakon povrede motorne grane femoralnog nerva i njegove rekonstrukcije tehnikom termino-terminalne anastomoze tokom perioda posmatranja u prvom, trećem, sedmom i 14. danu. Nije primećena atrofija mišića ni kod jedne od eksperimentalnih grupa (O i OT) prvog i trećeg dana od povrede. Sedmog dana od povrede, uočen je značajan stepen mišićne atrofije kod obe grupe operisanih životinja ( $0.21 \pm 0.03$  i  $0.17 \pm 0.04$  od intaktnog mišića) u odnosu na grupu lažno operisanih životinja. Razlika u masi mišića između grupa operisanih životinja (O i OT) nije bila značajna. Četrnaest dana od povrede konstatovana je progresija mišićne atrofije kod obe grupe operisanih životinja ( $0.37 \pm 0.07$  za O i  $0.33 \pm 0.09$  za OT grupu) u odnosu na vrednosti atrofije sedmog postoperativnog dana. Međutim, razlika u stepenu atrofije između O i OT grupa i dalje nije statistički značajna zbog uočljivih velikih standardnih devijacija posledice nepreciznosti testa.



Grafik 9. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na atrofiju mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva

*Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD.*

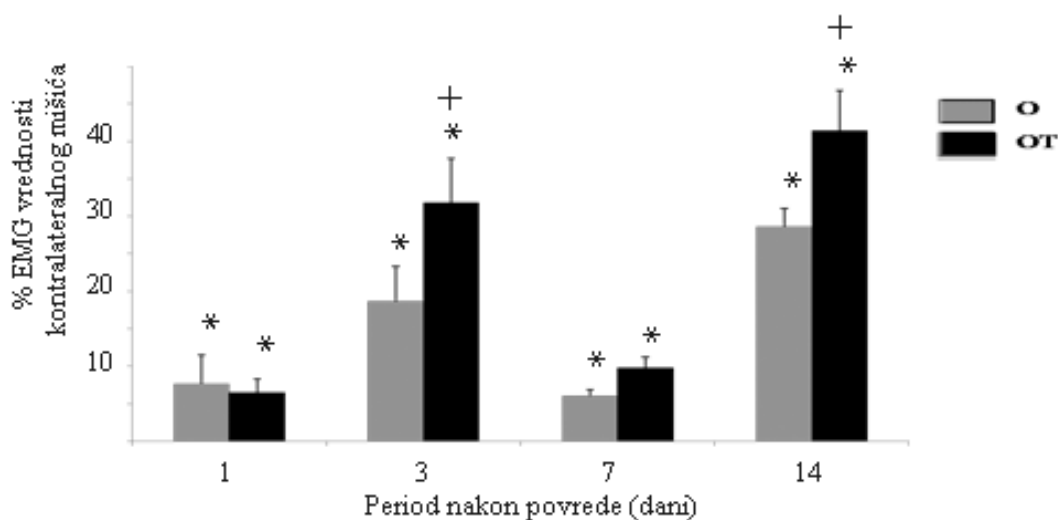
*\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p \leq 0.001$  vs L*

*L (belo) - lažno operisane životinje, O (sivo) – operisane životinje, OT (crno) - operisane i tretirane životinje*

### 4.2.3. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na elektromiografsku aktivnost mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva

Efekat terapije vitaminima B kompleksa na elektromiografsku aktivnost mišića kvadricepsa nakon povrede motorne grane *n. femoralis*-a i njegove rekonstrukcije prikazani su na grafiku 10. U poređenju sa kontralateralnim mišićem, EMG aktivnosti kvadricepsa obe operisane grupe životinja (O i OT) pokazuju značajno smanjenje vrednosti ( $7.67 \pm 3.84$  za O i  $6.52 \pm 1.83$  za OT grupu) bez statistički značajnih razlika između operisanih grupa.

Vrednosti EMG su povišene trećeg dana sa značajnom razlikom između operisanih grupa ( $18.66 \pm 4.70$  za O i  $31.84 \pm 5.89$  za OT grupu). Sedmog postoperativnog dana dolazi do pada vrednosti EMG za obe operisane grupe ( $6.07 \pm 0.80$  za O i  $9.79 \pm 1.48$  za OT) a potom do značajnog porasta vrednosti 14. dana oporavka ( $28.60 \pm 2.49$  za O i  $41.37 \pm 5.47$  za OT grupu). Tretman vitaminima B kompleksa je indukovao statistički značajno povećanje EMG aktivnosti u trećeg i 14. postoperativnog dana.



Grafik 10. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na EMG mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze motorne grane femoralnog nerva

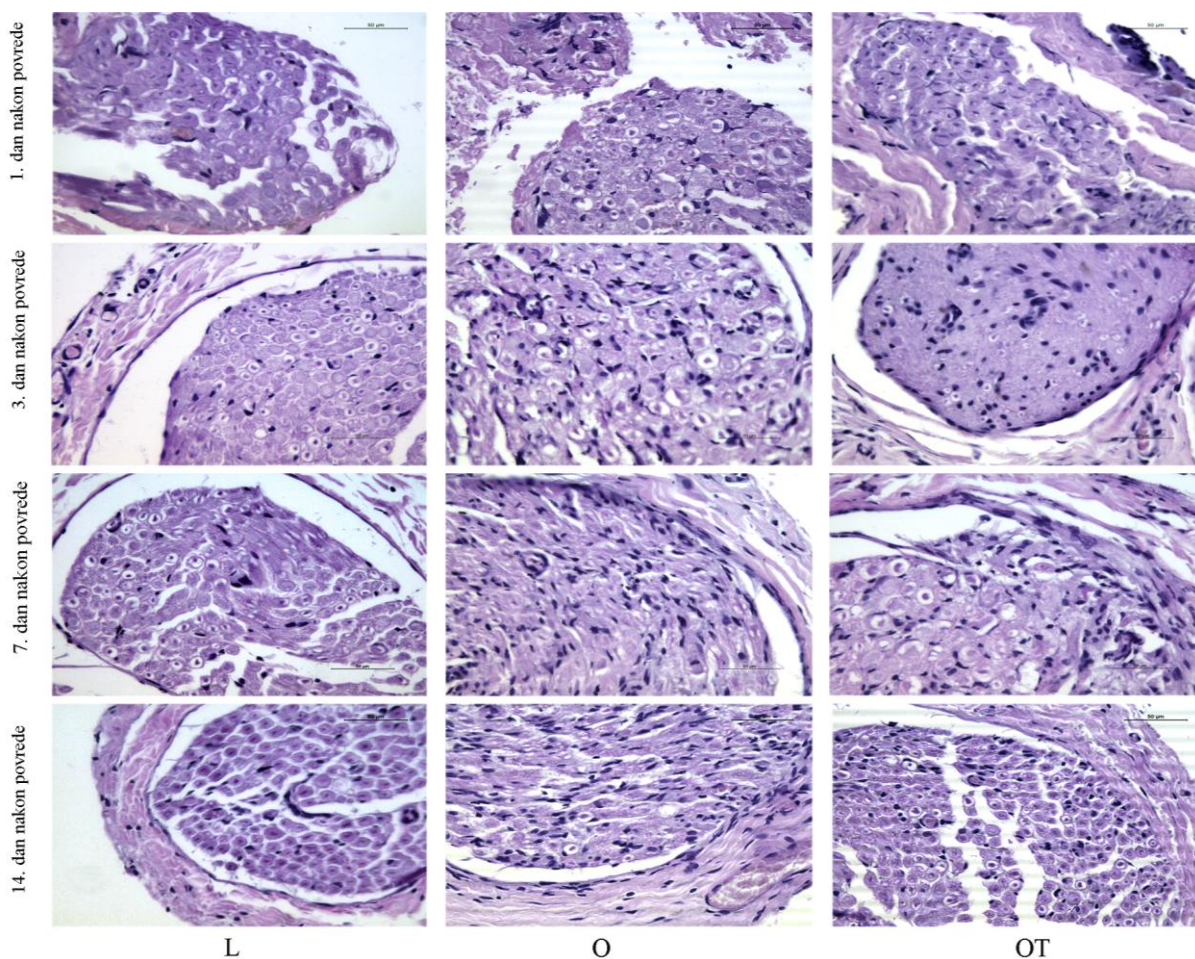
Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD

\*  $p < 0.01$  vs L

O (sivo) – operisane životinje, OT (crno) - operisane i tretirane životinje

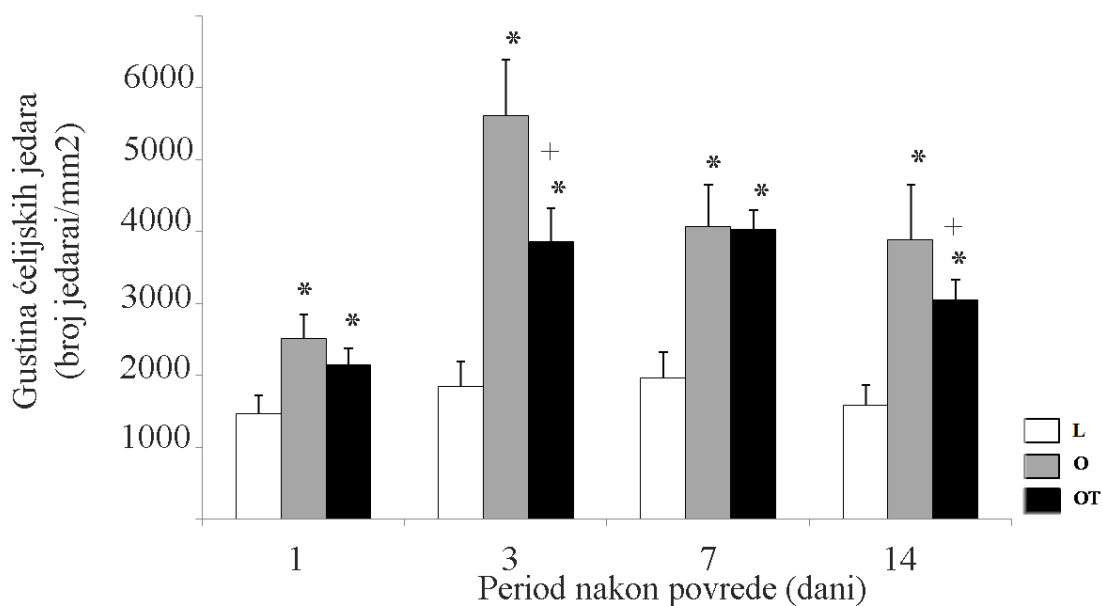
#### 4.2.4. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva

Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara u motornoj grani *n. femoralis*-a nakon njegove povrede i rekonstrukcije su prikazani na slici 25 i na grafiku 11.



Slika 25. Svetlosne mikrofografije poprečnih preseka intaktnih motornih grana femoralnih nerava lažno operisanih životinja (L) kao i rekonstruisanih motornih grana femoralnog nerva operisanih (O) i operisanih i tretiranih (OT) životinja

*Preparati nerva su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje.*



Grafik 11. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara motorne grane femoralnog nerva nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze. Pripremljeni preparati poprečnih preseka nerva su posmatrani pod mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje ukupne površine preseka, nakon čega su napravljene fotografije spajane u mozaik celog preseka. Jedra su izbrojana i određena je njihova gustina (broj ćelijskih jedara/mm<sup>2</sup>). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti gustine ćelijskih jedara.

\*  $p < 0.05$  vs L

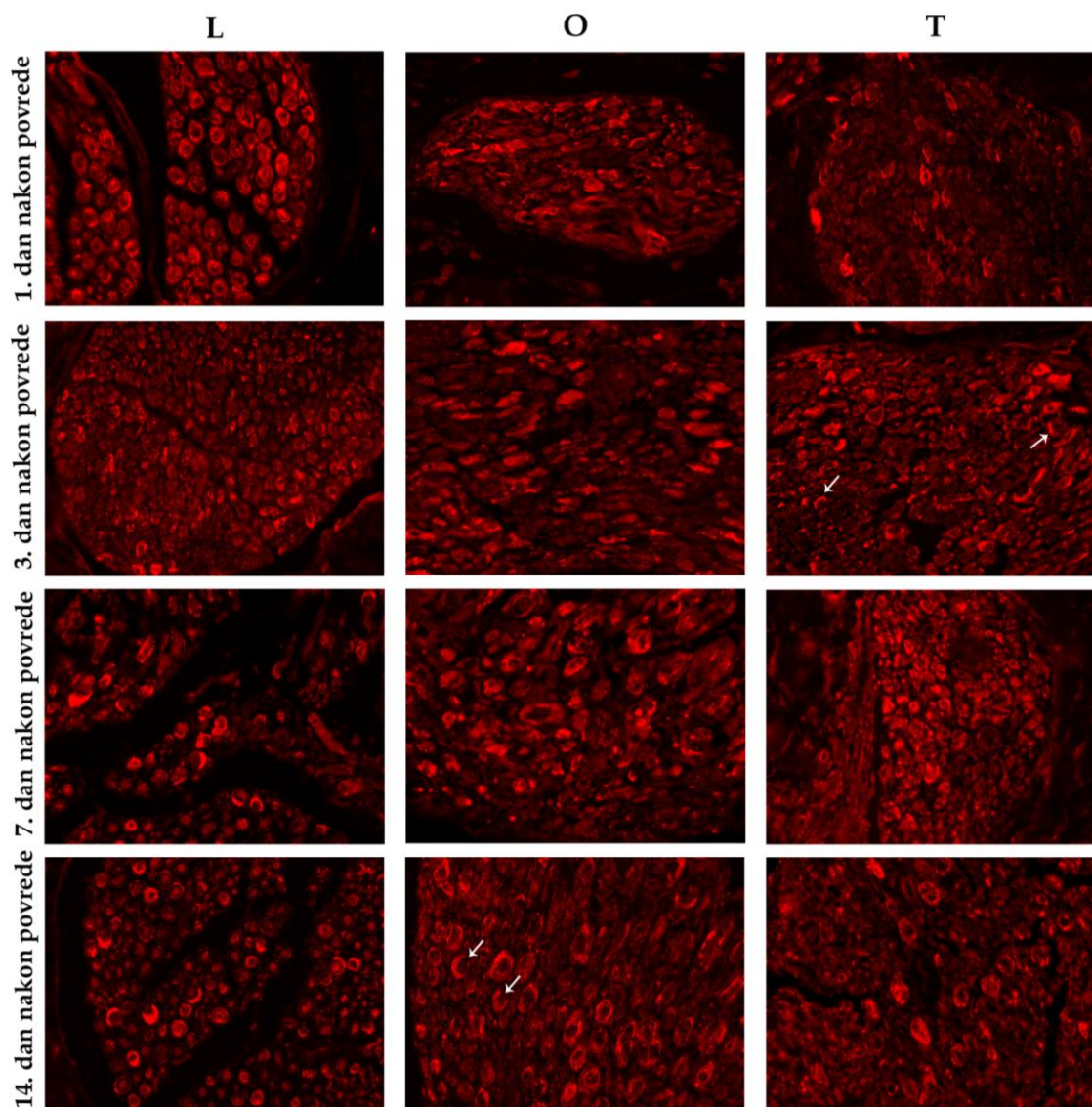
+  $p < 0.05$  vs O

L (belo) - lažno operisane životinje, O (sivo) - operisane životinje, OT (crno) - operisane i tretirane životinje

Sa grafika 11 se uočava da se kod obe grupe operisanih životinja beleži značajno povećanje gustine ćelijskih jedara u poređenju sa gustinom kod lažno operisanih životinja (2512.2 ± 334.3 za prvi, 5607.8 ± 778.1 za treći, 4034.0 ± 269.1 za sedmi i 3887.7 ± 764.9 za četrnaesti dan za O grupu, kao i 2149.8 ± 229.1 za prvi, 3862.4 ± 464.5 za treći, 4034.0 ± 269.1 za sedmi i 3052.2 ± 276.5 za četrnaesti dan za OT grupu). Kod lažno operisanih životinja su uočene značajno niže vrednosti (1471.5 ± 255.3 za prvi, 1846.7 ± 347.6 za treći, 1966.3 ± 351.3 za sedmi i 1581.4 ± 277.5 za četrnaesti dan). Povećanje gustine ćelijskih jedara rekonstruisanog nerva životinja iz OT

grupe je veće nego kod životinja O grupe, sa najvećim razlikama trećeg i četrnaestog dana kada postoji i statistički značajna razlika.

#### 4.2.5. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo Švanovih ćelija u femoralnom nervu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze



Slika 26. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo Švanovih ćelija u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka. U cilju detekcije prisustva Švanovih ćelija korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima

*specifičnim za S100 protein. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a operisanih životinja.*

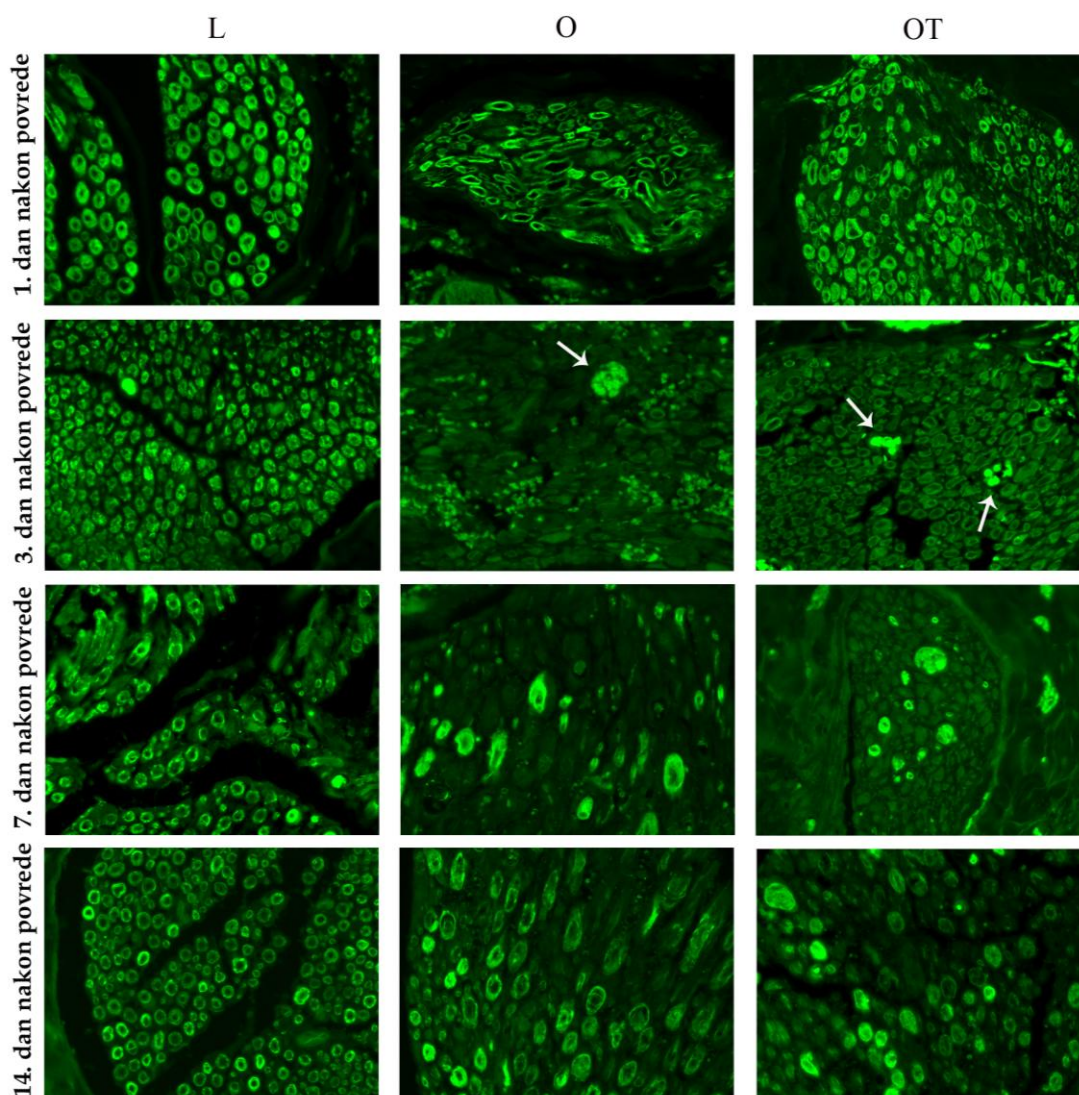
*Strelice označavaju srpaste Švanove ćelije. Uvećanje 40x.*

Na slici 26 je prikazan efekat primenjene terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo Švanovih ćelija u motornoj grani femoralnog nerva nakon transekcije i rekonstrukcije termino-terminalnom anastomozom. Sa slike se uočava da je imunoreaktivnost za S100 protein smanjena prvog postoperativnog dana u nervu samo operisanih (O) i u nervu operisanih i tretiranih životinja (OT) u poređenju sa lažno operisanim životinjama (L). U trećem danu kod operisanih životinja (O) se uočava pojačana imunoreaktivnost koja ukazuje na prisustvo dediferenciranih Švanovih ćelija, dok se kod operisanih i tretiranih životinja (OT) već uočava prisustvo srpastih mijelinizirajućih Švanovih ćelija (označene strelicama). U sedmom danu kod operisanih životinja (O) uočava se prisustvo imunoreaktivnosti za S100 oko velikog broja aksona što ukazuje na prisustvo diferenciranih Švanovih ćelija koje još uvek nemaju karakterističan srpast oblik. S druge strane kod životinja operisanih i tretiranih vitaminima B kompleksa uočava se povećanje broja srpastih Švanovih ćelija u poređenju sa trećim danom. U 14. postoperativnom danu kod samo operisanih životinja (O) uočava se prisustvo srpastih Švanovih ćelija, dok se kod operisanih i tretiranih životinja (OT) imunoreaktivnost za S100 protein vraća na normalan nivo sličan onom detektovanom kod lažno operisanih životinja (L).

#### **4.2.6. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo mijelin baznog proteina u femoralnom nervu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze**

Na slici 27 je prikazan efekat terapije kompleksom vitamina B na strukturu mijelinskog omotača procenjivano prisustvom imunoreaktivnosti za MBP na poprečnim presecima motorne grane femoralnog nerva lažno operisanih (L), operisanih (O) i operisanih i tretiranih (OT) životinja. Uočava se da u je u prvom postoperativnom danu obrazac imunoreaktivnosti za MBP kod operisanih (O) i operisanih i tretiranih (OT) životinja nešto malo promenjena u odnosu na lažno operisane (L) životinja. Kod operisanih životinja (O) imunoreaktivnost za MBP koja se uočava oko aksona je manje

debljine u poređenju sa istom kod OT životinja. U trećem postoperativnom danu kod operisanih životinja (O) jasno se uočava tačkasta imunoreaktivnost za MBP koja ukazuje na prisustvo razgrađenog mijelina. S druge strane, kod operisanih i tretiranih životinja (OT) nije došlo do razgradnje mijelina jer se ne uočava tačkasta imunoreaktivnost za MBP već je prisutna kružna imunoreaktivnost koja je manjeg intenziteta u poređenju sa detektovanom na presecima lažno operisanih životinja.



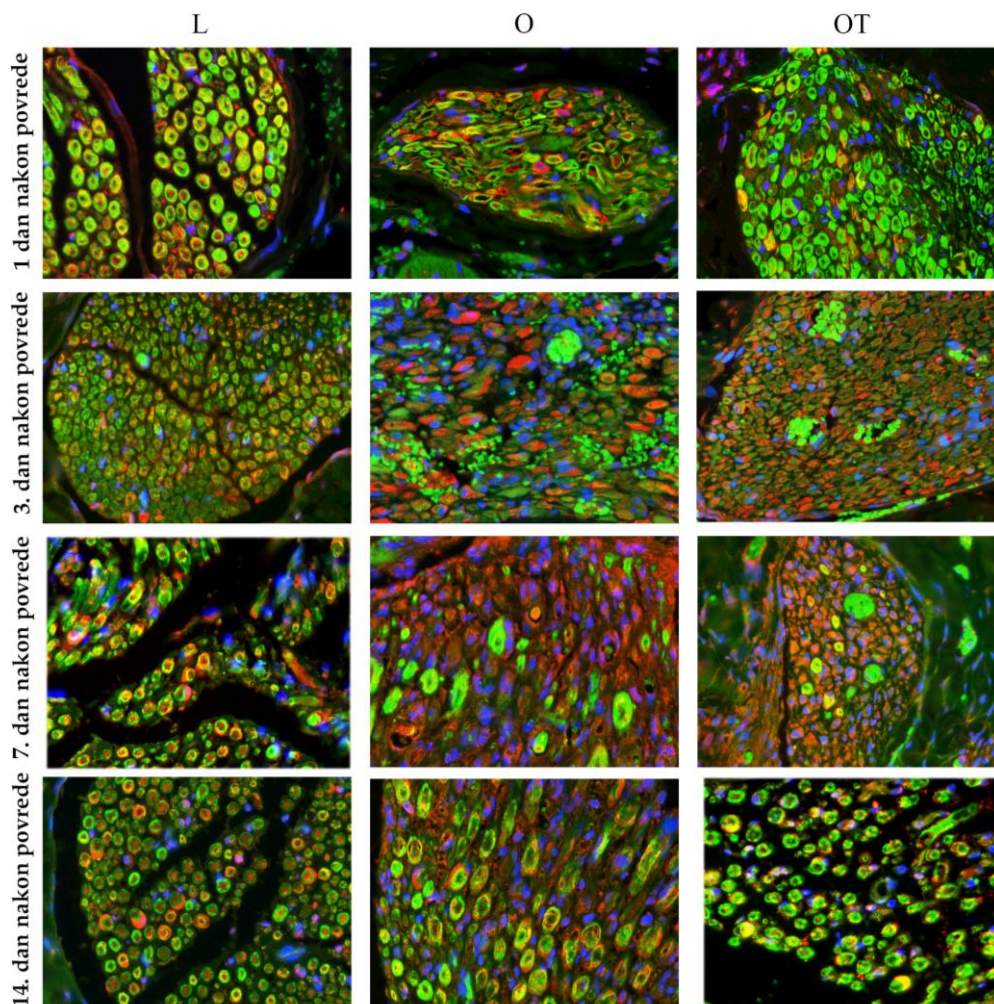
Slika 27. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo mijelin baznog proteina u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

*U cilju detekcije promena u mijelinskom omotaču korišćeno je imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifičnim za MBP. Rezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih*



preseka rekonstruisane motorne grane *n. femoralis*-a operisanih životinja. Strelice označavaju krvni sud. Uvećanje 40x.

Dalje je u urađeno dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane *n. femoralis*-a antitelima specifičnim za MBP i S100 protein i ove rezultat ovog bojenja je prikazan na slici 28. Sa ove slike se jasno uočava da u trećem i sedmom danu kod operisanih (O) životinja ne postoji kolokalizacija imunoreaktivnosti za oba proteina što potvrđuje prethodni nalaz o prisustvu dediferenciranih nemijelinizirajućih Švanovih ćelija i razgrađenog mijelina. Kod ovih životinja (O) kolokalizacija se uočava tek 14. postoperativnog dana.



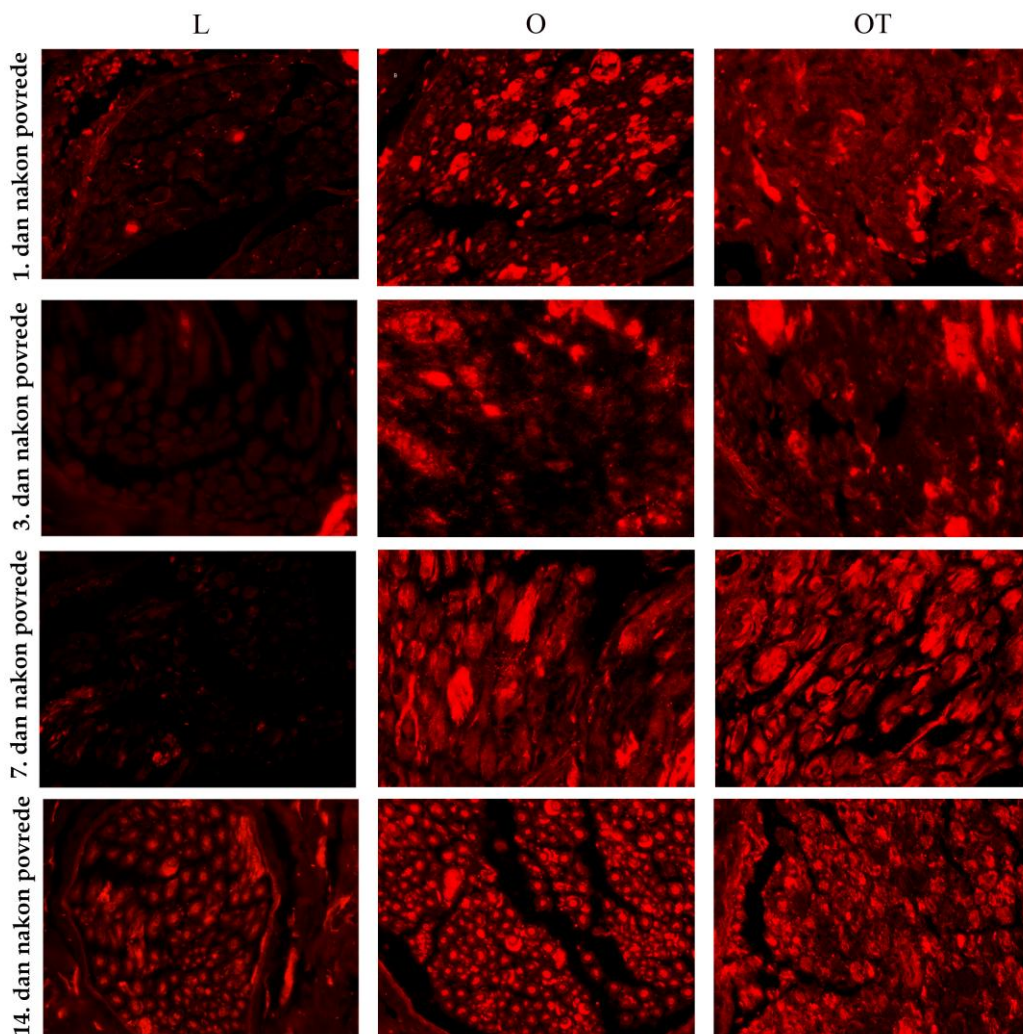
Slika 28. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo mijelin baznog proteina (zeleno) i S100 (crveno) u rekonstruisanoj motornoj grani femoralnog nerva tokom ispitivanog perioda oporavka

*U cilju istovremene detekcije promena u mijelinskom omotaču i prisustva Švanovih ćelija korišćeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a antitelima specifičnim za MBP i S100 protein. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka rekonstruisane motorne grane n. femoralis-a operisanih životinja. Uvećanje 40x.*

S druge strane, kod operisanih i tretiranih životinja (OT) uočava se kolokalizacija oba proteina u svim terminima, s tim što je trećeg i sedmog dana prisutnija crvena imunoreaktivnost koja ukazuje na povećano prisustvo Švanovih ćelija. Prvog i 14. dana je kolokalizacija slična onoj kod lažno operisanih životinja (L).

#### **4.2.7. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na izrastanje aksona u femoralnom nervu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze**

Na slici 29 je prikazana ekspresija GAP-43 molekula koji ukazuje na proces prorastanja aksona i samim tim oporavak nerva nakon povrede. Sa slike se može videti da je terapija vitaminima B dovela do bržeg oporavka nerva.



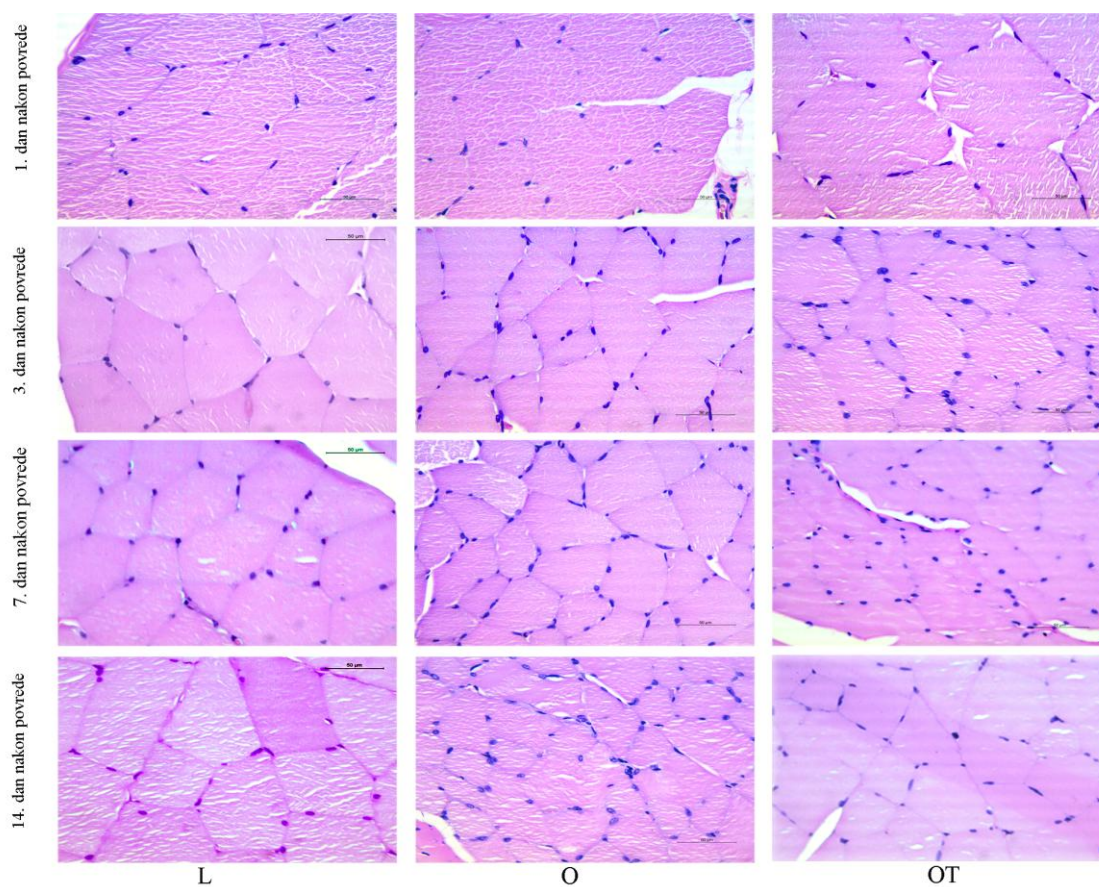
Slika 29. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na ekspresiju GAP-43 u povređenom nervu tokom ispitivanog vremena oporavka

*U cilju detekcije prisustva Švanovih ćelija korišćeno je imunofluorescentno bojenje n. femoralis-a nakon transekcije i rekonstrukcije i tretmana vitamina B kompleksa. Reprezentativni poprečni preseki n. femoralis-a operisanih O životinja. Uvećanje 40x.*

#### **4.2.8. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara mišića kvadricepsa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva**

Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara mišića kvadricepsa nakon povrede motorne grane *n. femoralis-a* i njegove rekonstrukcije

prikazani su na slici 30 i grafiku 12.



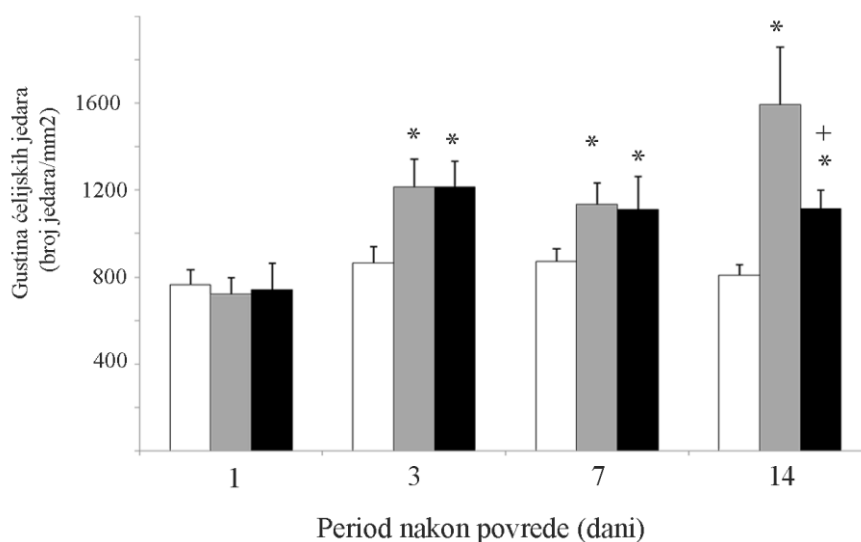
Slika 30. Svetlosne mikrografije poprečnih preseka mišića kvadricepsa inervisanih femoralnim nervom lažno operisanih životinja (L) kao i rekonstruisanim femoralnim nervom operisanih (O) i operisanih i tretiranih (OT) životinja

*Preparati nerva su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i pri uvećanju od 40 puta je vršeno slikanje.*

Na mikrografijama prikazanim na slici 30 može se uočiti da je gustina jedara u mišiću inervisanom rekonstruisanim nervom i netretiranih i tretiranih operisanih životinja statistički značajno veća u poređenju sa vrednostima kod lažno operisanih životinja trećeg, sedmog i 14. dana nakon povrede. Takođe, gustina jedara mišića inervisanih rekonstruisanim nervom tretiranih životinja 14 dana nakon povrede pokazuje smanjenje u odnosu na vrednosti izmerene kod netretiranih životinja.

Na grafiku 12 su prikazane numeričke vrednosti gustine ćelijskih jedara mišića kvadricepsa inervisanih operisanim nervom. Sa ovog grafika se uočava da prvog dana

nakon povrede, nije uočena značajna razlika u gustine ćelijskih jedara mišića kvadricepsa između O, OT i L grupe ( $722.1 \pm 74.8$ ,  $742.0 \pm 121.6$  i  $764.9 \pm 67.7$ ). Značajan porast gustine ćelijskih jedara mišića između operisanih životinja (grupe O i OT) i lažno operisanih (L grupa) je uočen trećeg dana nakon povrede i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva ( $1214.6 \pm 128.6$  i  $1215.7 \pm 115.7$  za O i OT grupu, odn.  $865.3 \pm 73.4$  za L grupu). Ovaj trend je zadržan kod obe grupe operisanih životinja (O i OT) i u sedmom danu ( $1135.4 \pm 97.1$  za O i  $1109.9 \pm 153.8$  za OT grupu). Četrnaestog dana, mišićna celularnost je značajno porasla u grupi netretiranih životinja ( $1594.4 \pm 265.2$ ) u odnosu na grupu tretiranih životinja ( $1114.5 \pm 86.1$ ) i grupu lažno operisanih životinja ( $810.0 \pm 47.3$ ) kod kojih su vrednosti četrnaestog dana odgovarale vrednostima gustini ćelijskih jedara sedmog dana.



Grafik 12. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na gustinu ćelijskih jedara mišića kvadricepsa nakon povrede femoralnog nerva

*Prpripremljeni preparati poprečnih preseka mišića kvadricepsa su posmatrani pod mikroskopom i slikani pri uvećanju od 40 puta. Pravljeni su 20 fotografija različitih regiona preseka. Jedra su izbrojana i određena je njihova gustina (broj jedara/mm<sup>2</sup>).*

*Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti gustine ćelijskih jedara.*

\*  $p < 0.05$  vs L

+  $p < 0.05$  vs O

*L (belo) - lažno operisane životinje, O (sivo) - operisane životinje, OT (crno) - operisane i tretirane životinje*

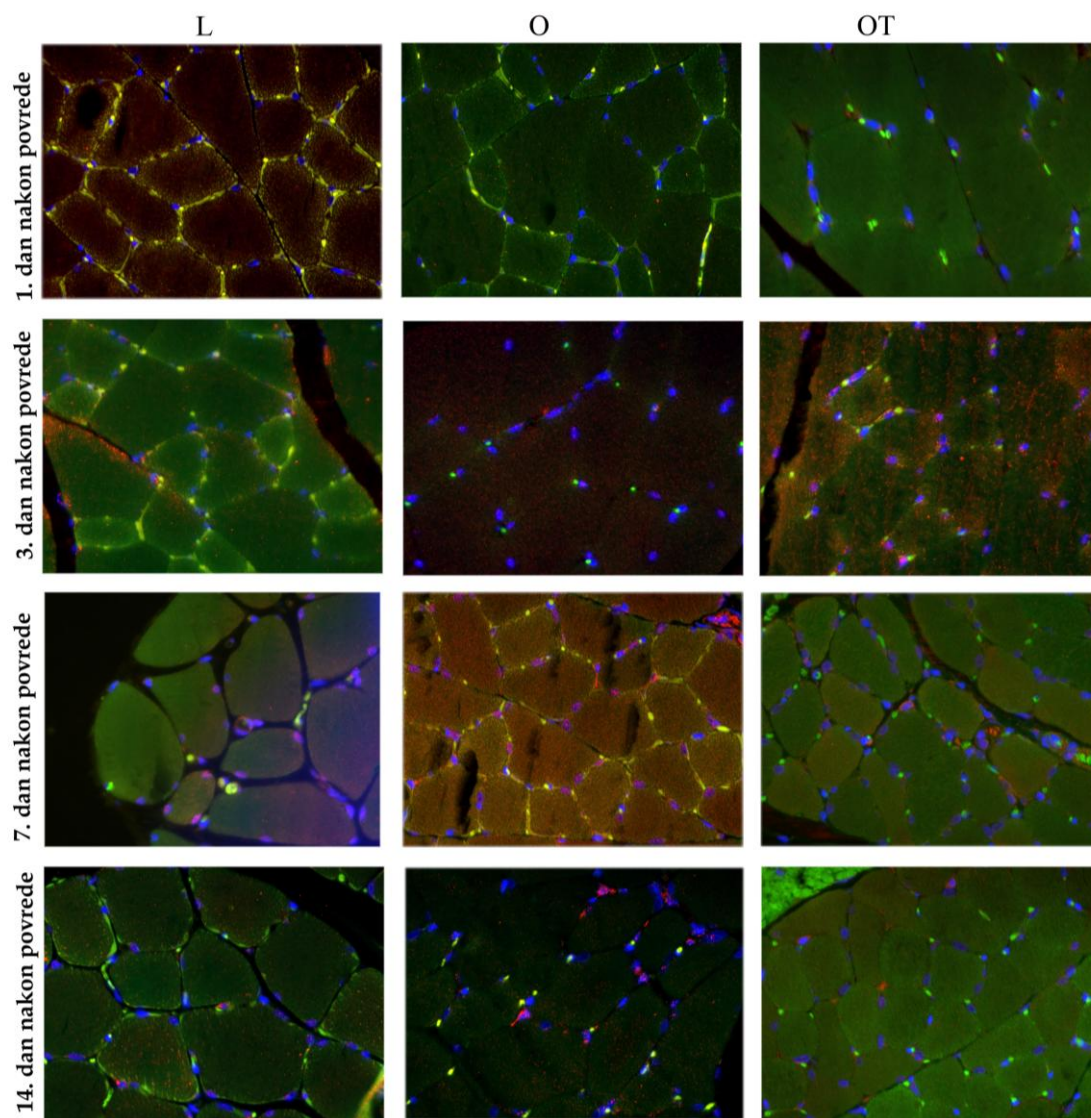
#### **4.2.9. Efekat terapije vitaminima B kompleksa na prisustvo satelitskih ćelija u mišiću kvadricepsu nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva**

Skeletni mišić raste i regeneriše se zahvaljujući satelitskim ćelijama. U fiziološkim uslovima, u neoštećenom mišiću, većina satelitskih ćelija su mirujuće ćelije koje eksprimiraju transkripcioni faktor Pax7. Jedarni protein Ki-67 je odličan marker proliferišućih ćelija i koristili smo ga za evaluaciju aktivnih satelitskih ćelija u ukupnoj populaciji ovih ćelija. Fluorescentna boja DAPI vezuje se za DNK i koristi za vizualizaciju jedara.

Kod lažno operisane grupe (slika 31 L) u svim posmatranim danima nema razlike u ekspresiji ispitivanih markera. Uočljiv je manji broj ćelija, od kojih su većina mirujuće satelitske ćelije koje eksprimiraju Pax7 (preklopljeno sa DAPI - žuto). Prisutno je svega nekoliko aktiviranih satelitskih ćelija kod kojih je pojačana imuno reakcija na protein Ki-67, a smanjena na Pax7 (preklopljeno sa DAPI - ljubičasto).

Kao odgovor na oštećenje mišića satelitske ćelije se aktiviraju. U toku njihove proliferacije ekspresija Pax7 se smanjuje, a izrazito pojačava nakon diferencijacije satelitskih ćelija. U prvom danu nema razlike u broju ćelija ili intenzitetu imunoreakcije kod operisane grupe u odnosu na lažno operisane životinje (slika 31, L i O). U trećem danu na mišićima inervisanim rekonstruisanom granom *n. femoralisa* povećan je broj jedara (slika 31, marker DAPI, plavo). U sedmom danu uočljivo je povećanje broja proliferišućih (ljubičasto), kao i diferenciranih satelitskih ćelija (žuto). U 14. danu nakon operacije broj proliferišućih ćelija se smanjuje, ali je primetno veći u odnosu na kontrolnu grupu.

Ekspresija ispitivanih markera kod grupe sa tretmanom vitaminima B kompleksa nakon transekcije i termino-terminalne anastomoze femoralnog nerva slična je onoj viđenoj kod L grupe (slika 31) što se može objasniti manjim oštećenjem motorne grane femoralnog nerva kod tretiranih životinja (slika 16 i slika 27).



Slika 31. Ekspresija Pax7 (zeleno) i Ki-67 (crveno) u mišiću kvadricepsu lažno operisanih kao i u mišiću kvadricepsu inervisanom rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva operisanih i operisanih tretiranih životinja

*U cilju detekcije prisustva satelitskih ćelija korišćeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje poprečnih preseka tkiva mišića kvadricepsa antitelima specifičnim za Pax7 i Ki-67. Reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja poprečnih preseka mišića kvadricepsa. Uvećanje 40x.*

### 4.3. EFEKAT POVREDE FEMORALNOG NERVA NA FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE PERITONEALNIH MAKROFAGA

Treći deo ove doktorske disertacije se odnosi na ispitivanje uticaja povrede *n. femoralis-a* na fenotipske i funkcionalne karakteristike peritonealnih makrofaga kao značajne populacije rezidentnih makrofaga koje su sposobne da odgovore na sistemske promene u organizmu. U ovom delu je ispitan i efekat primenjene terapije vitaminima B kompleksa na karakteristike ovih ćelija izolovanih sedam dana nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane *n. femoralis-a*.

#### 4.3.1. Karakterizacija ćelijskih populacija peritonealnog lavata nakon povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa

Tabela 8. Procentualna zastupljenost ćelija peritonealnog lavata u eksperimentalnim grupama

	Mo/Mf	Gr	Mast	Ly
Intaktne	60.7 ± 4.1	28.3 ± 3.9	7.3 ± 1.5	2.7 ± 0.6
Intaktne + fiziološki	60.3 ± 1.5	30.3 ± 2.5	6.0 ± 1.0	2.3 ± 0.6
Intaktne + vitamin B	55.0 ± 3.0	35.3 ± 0.6	7.0 ± 2.0	2.7 ± 0.6
Lažno operisane	64.0 ± 4.0	28.0 ± 4.0	8.0 ± 1.0	1.0 ± 0.5
Lažno operisane + fiziološki	55.7 ± 7.8	40.0 ± 7.6	3.0 ± 1.0	1.3 ± 0.6
Lažno operisane + vitamin B	62.0 ± 1.0	34.0 ± 1.0	3.7 ± 0.6	1.0 ± 1.0
Operisane	60.2 ± 4.9	29.8 ± 4.9	8.7 ± 1.7	1.3 ± 0.8
Operisane + fiziološki	66.5 ± 8.0	23.8 ± 9.4	5.0 ± 5.4	4.8 ± 4.3
Operisane + vitamin B	62.3 ± 4.7	30.7 ± 5.5	4.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0

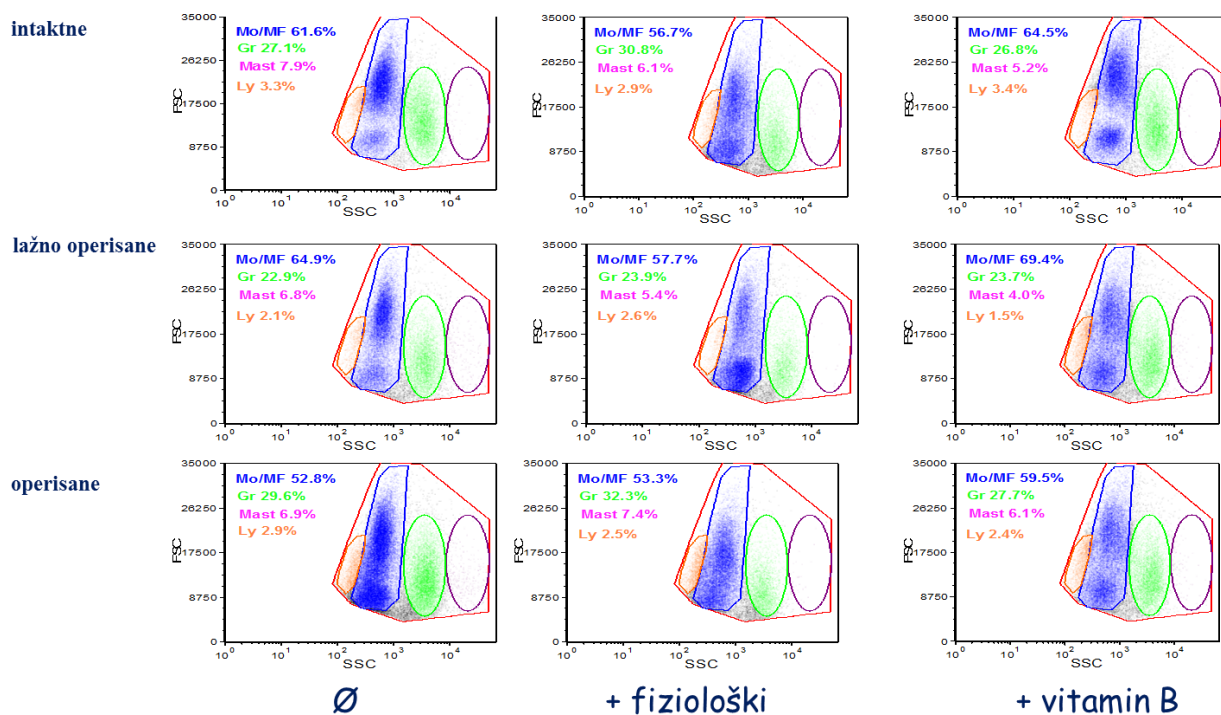


Citospin preparati ukupnih ćelija peritonealnih lavata izolovanih iz životinja svih ispitivanih grupa su analizirani i određen je procenat različitih populacija ćelija na osnovu njihove morfologije. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE procenta ćelijskih populacija.

MO/Mf-monocitno/makrofagne ćelije, Gr-granulociti, Mast-mast ćelije, Ly-limfociti

U tabeli 8 je prikazana procentualna zastupljenost različitih ćelijskih populacija prisutnih u ukupnom peritonealnom lavatu životinja svih eksperimentalnih grupa sedmog dana nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane *n. femoralis*-a tehnikom termino-terminalne anastomoze.

Na osnovu podataka prikazanih u ovoj tabeli može se zaključiti da povreda perifernog nerva, kao ni primenjeni tretmani (fiziološki rastvor/vitamini B kompleksa) nisu imali efekat na procentualnu zastupljenost ćelijskih populacija u peritonealnom lavatu. Ovaj nalaz je potvrđen i citometrijskom analizom na osnovu veličine i granularnosti ćelija zastupljenih u ukupnom peritonealnom lavatu (slika 32).

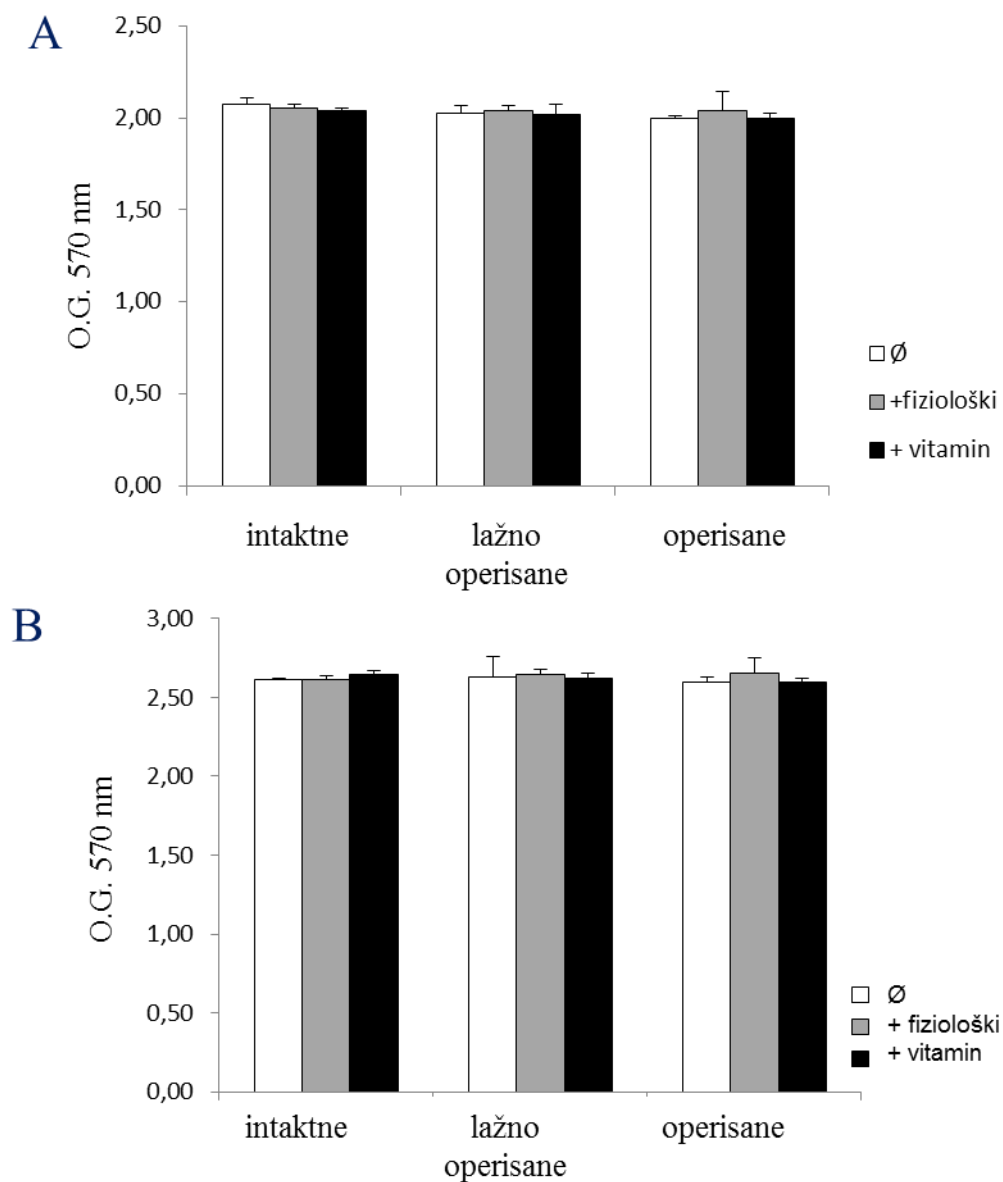


Slika 32. Citometrijska analiza ukupnih ćelija peritonealnog lavata

Ukupne ćelije peritonealnog lavata analizirane su na protočnom citometru i dobijeni su dot-plot histogrami na kojima se mogu razlikovati ćelije na osnovu njihove veličine i granularnosti

MO/Mf (plavo)-monocitno/makrofagne ćelije, Gr (zeleno)-granulociti, Mast (roze)-mast ćelije, Ly (narandžasto)-limfociti

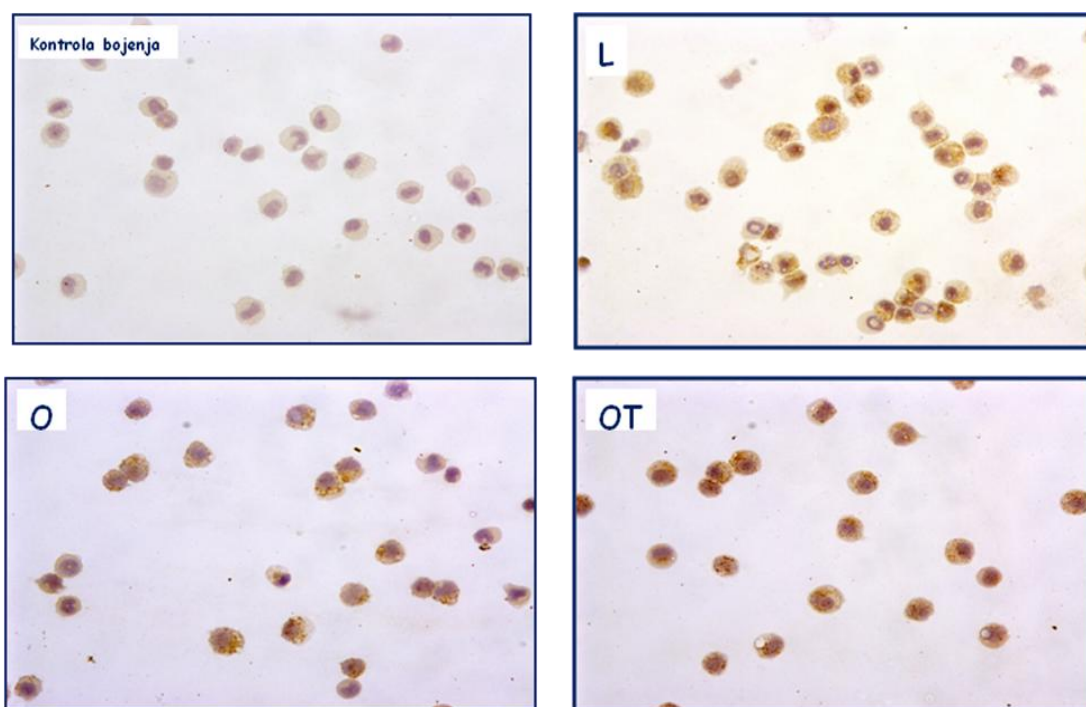
Potom je ispitana *ex vivo* metabolička vijabilnost ukupnih ćelija peritonealnog lavata i rezultati su prikazani na grafiku 13. Ovim ispitivanjem je pokazano da sama povreda nerva kao ni primenjeni tretmani, fiziološki rastvor i vitamini B kompleksa, ne dovode do promene metaboličke vijabilnosti ukupnih ćelija peritonealnog lavata.



Grafik 13. Metabolička vijabilnost ukupnih ćelija peritonealnog lavata

*Količina redukovanog MTT, koja ukazuje na broj metabolički aktivnih makrofaga, merena je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana je sposobnost redukcije MTT-a ex vivo bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti relativne promene optičke gustine (O.G.).*

Imajući u vidu da nije došlo do promena u procentualnoj zastupljenosti populacija ćelija peritonealnog lavata kao ni njihove metaboličke vijabilnosti izvršeno je obogaćivanje populacije peritonealnih makrofaga na gradijentu gustine. Nakon tog postupka dobijena je obogaćena populacija peritonealnih makrofaga (PMF), populacija ćelija koje su preko 85% CD68 pozitivne. Analizom broja CD68 pozitivnih ćelija u testiranim grupama pokazano je da ne postoje razlike u zastupljenosti ovih ćelija između ispitivanih grupa životinja (slika 33). Populacija PMF pripremljena na ovaj način je dalje korišćena za sva fenotipska i funkcionalna ispitivanja.



Slika 33. Imunohistohemijsko obeležavanje CD68 molekula u obogaćenoj populaciji peritonealnih makrofaga izolovanoj sedmog dana nakon povrede motorne grane femoralnog nerva i primene terapije vitaminima B kompleksa  
*Reprezentativni citospin preparati obogaćene populacije peritonealnih makrofaga lažno operisanih (L), operisanih (O) i operisanih, tretiranih (OT) životinja. Uveličanje 40X.*

### 4.3.2. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije na fenotipske karakteristike peritonealnih makrofaga

U tabeli 9 su prikazani rezultati fenotipske analize obogaćene populacije PMF iz svih eksperimentalnih grupa životinja.

Tabela 9. Fenotipska analiza obogaćene populacije peritonealnih makrofaga izolovane sedmog dana nakon povrede motorne grane femoralnog nerva i primene terapije vitaminima B kompleksa

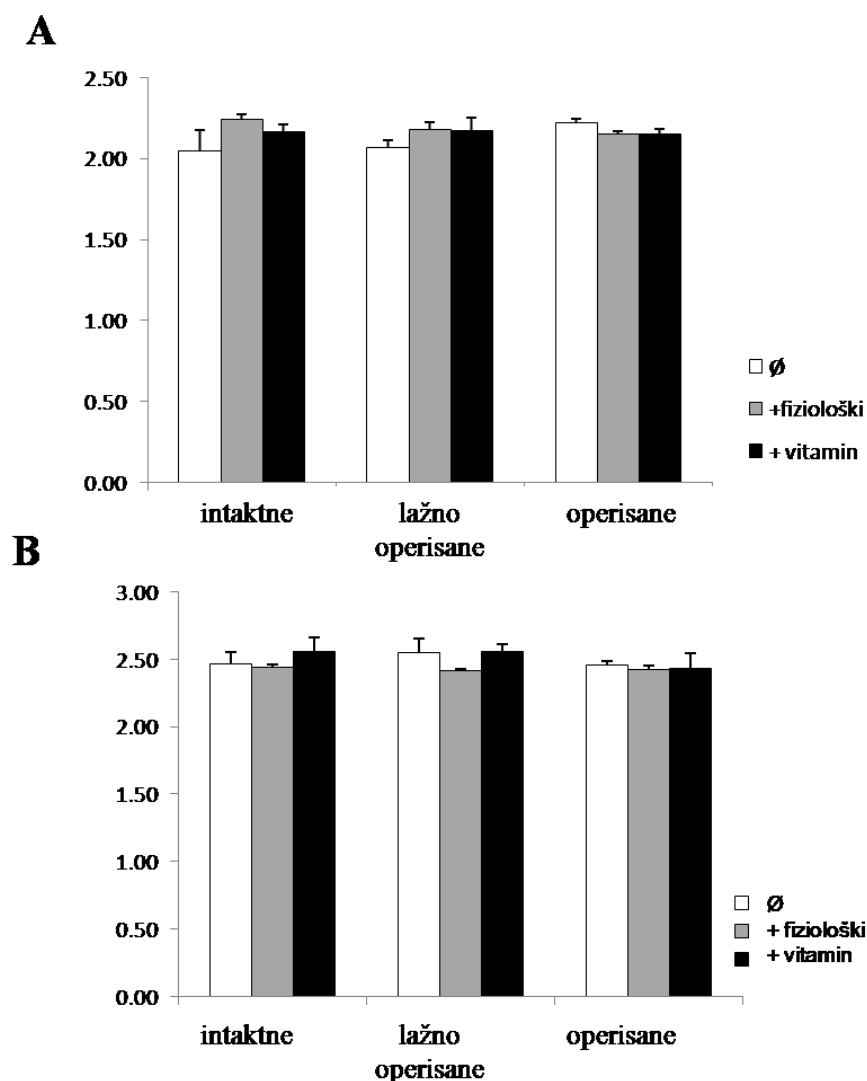
	CD11b		CD80		CD86		MHCII		CD54	
	%	mean	%	mean	%	mean	%	mean	%	mean
Intaktne	96.4	5236	42.3	837	45.9	675	31.0	337	38.6	548
Intaktne + fiziološki	96.4	4777	44.1	904	49.1	689	35.8	474	53.2	831
Intaktne + vitamin B	96.9	4834	46.0	886	50.7	701	35.8	600	64.5	719
Lažno operisane	98.1	4166	42.8	756	46.7	651	31.9	353	43.8	505
Lažno operisane + fiziološki	95.2	4507	42.4	851	51.1	708	33.5	441	70.9	711
Lažno operisane + vitamin B	98.3	5091	40.9	800	45.9	623	61.6	612	65.1	697
Operisane	88.1	4166	40.4	900	41.7	615	41.5	1807	33.3	449
Operisane + fiziološki	84.2	3867	42.5	879	42.4	600	42.9	672	51.8	949
Operisane + vitamin B	89.5	4420	40.8	899	45.6	630	39.6	669	55.1	487

Iz tabele se uočava da povreda nerva dovodi do statistički značajnog povećanja ekspresije MHCII, CD80 i CD54 molekula na površini peritonealnih makrofaga izolovanih iz operisanih životinja u poređenju sa PMF izolovanim iz lažno operisanih životinja.

### 4.3.3. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na *ex vivo* karakteristike peritonealnih makrofaga

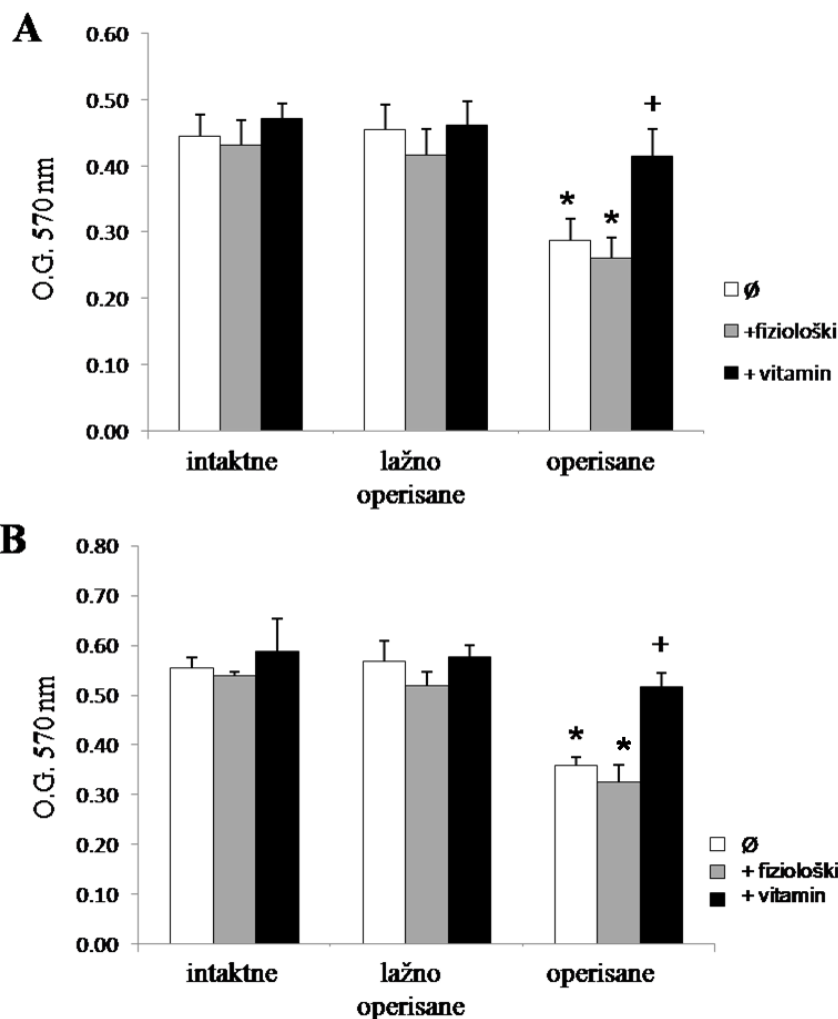
Na grafiku 14 je prikazana *ex vivo* metabolička vijabilnost obogaćene populacije PMF svih ispitivanih grupa životinja. Sa grafika se uočava da sama povreda perifernog

nerva kao ni primenjeni tretmani, fiziološki rastvor i vitamini B kompleksa, nisu uticali na metaboličku aktivnost PMF.



Grafik 14. Metabolička vijabilnost obogaćene populacije peritonealnih makrofaga. Količina redukovanog MTT, koja ukazuje na broj metabolički aktivnih makrofaga, merena je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana je sposobnost redukcije MTT-a *ex vivo* bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti optičke gustine (O.G.).

Potom je kao važna karakteristika makrofaga određivana sposobnost fagocitoze/pinocitoze i rezultati *ex vivo* sposobnosti fagocitoze/pinocitoze su prikazani na grafiku 15.



Grafik 15. Sposobnost pinocitoze obogaćene populacije peritonealnih makrofaga  
*Količina pinocitovanog Neutral red-a, kao pokazatelj pinocitozne sposobnosti aktiviranih makrofaga, merena je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana je sposobnost pinocitoze Neutral red-a ex vivo bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti optičke gustine (O.G.).*

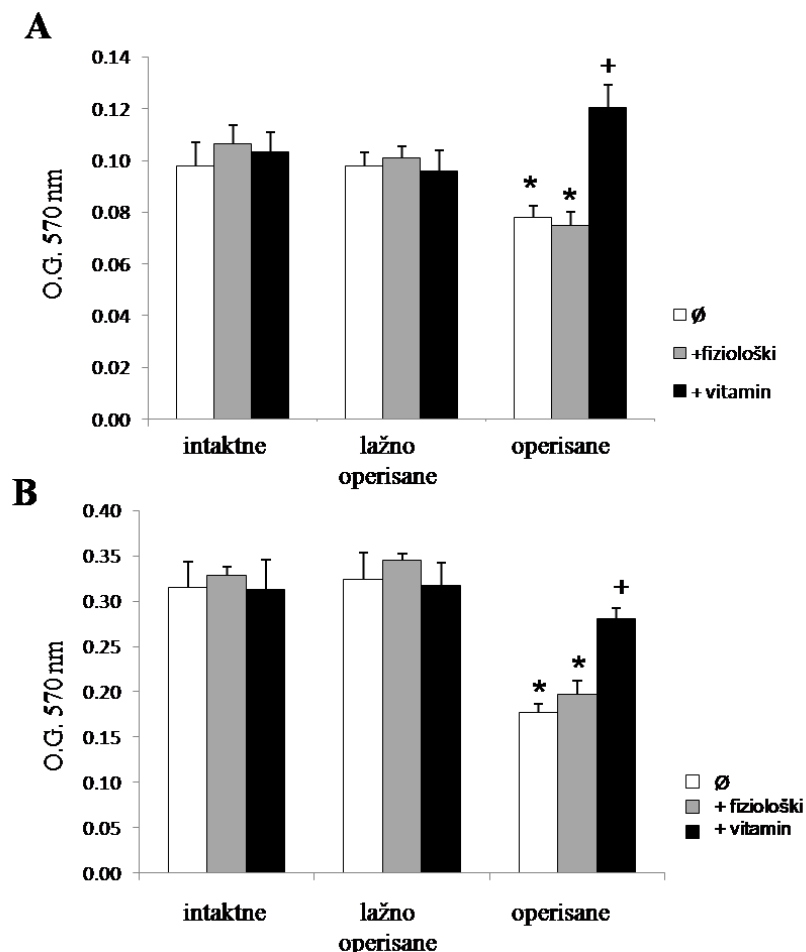
\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane

+  $p < 0.05$  vs operisane

Rezultati testa pinocitoze pokazuju da je povreda motorne grane femoralnog nerva indukovala smanjenje *ex vivo* spontane i stimulisane sposobnosti fagocitoze/pinocitoze PMF kao i da je tretman vitaminima B kompleksa uspeo da oporavi i spontanu i stimulisanu sposobnost fagocitoze/pinocitoze.

Pored ovoga ispitana je i sposobnost *ex vivo* adhezije izolovanih PMF za

plastiku kao važan pokazatelj funkcionalnog statusa PMF. Rezultati ovog testa su prikazani na grafiku 16.



Grafik 16. Sposobnost adhezije obogaćene populacije peritonealnih makrofaga *Intenzitet rastvorene boje (metilenskog plavog), koji je direktno srazmeran broju ćelija koje su adherirale za plastiku, meren je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivan je broj ćelija koje su adherirale za plastiku ex vivo bez (A) i u prisustvu stimulatora PMA-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti optičke gustine (O.G.).*

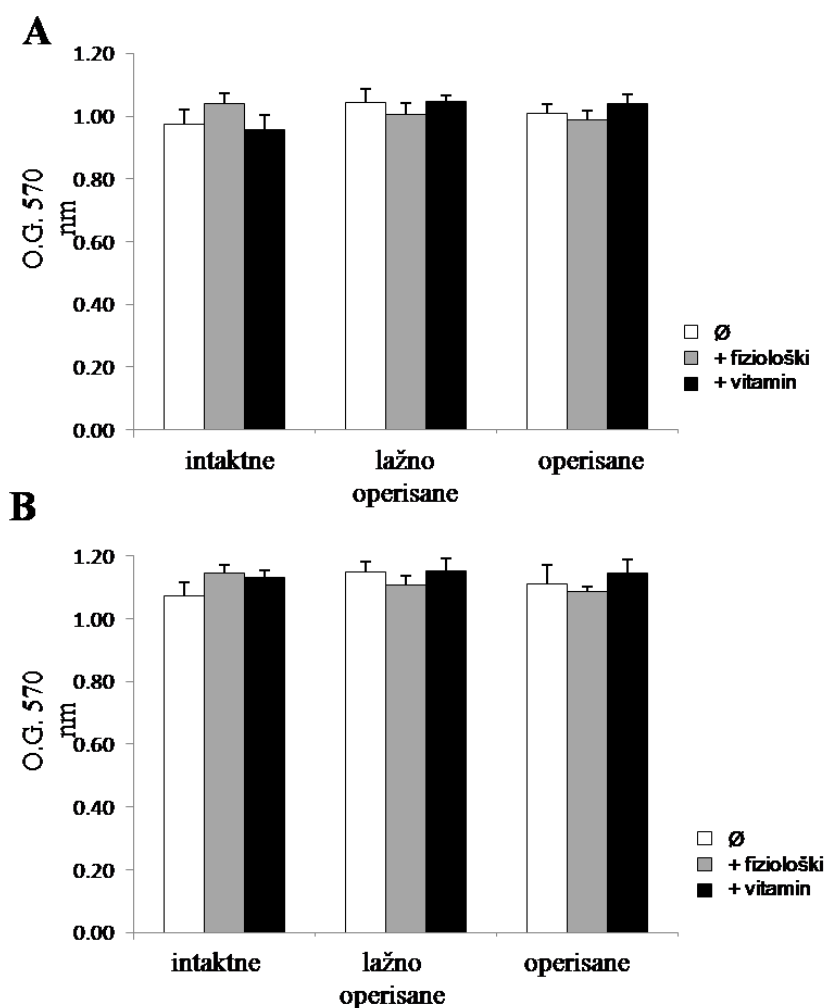
\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane

+  $p < 0.05$  vs operisane

Test adhezije je pokazao isti efekat povrede femoralnog nerva na sposobnost adhezije PMF kao i za pinocitoznu sposobnost. PMF izolovani iz operisanih životinja su imale manju spontanu i stimulisanu sposobnost adhezije u poređenju sa PMF lažno operisanih životinja. Takođe, tretman operisanih životinja vitaminima B kompleksa je

doveo do oporavka sposobnosti adhezije PMF i vratio je na nivo zabeležen za PMF lažno operisanih životinja.

#### 4.3.4. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na metaboličku aktivnost peritonealnih makrofaga *in vitro*



Grafik 17. Metabolička vijabilnost obogaćene populacije peritonealnih makrofaga Količina redukovanoj MTT, koja ukazuje na broj metabolički aktivnih makrofaga, merena je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana je sposobnost redukcije MTT-a *in vitro* bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti optičke gustine (O.G.).

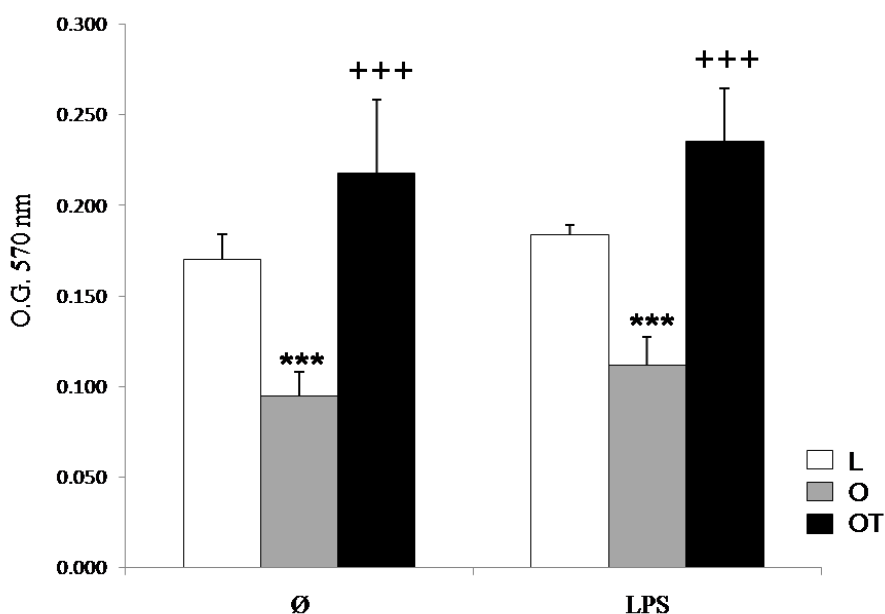


Ispitivanjem metaboličke vijabilnosti kultivisanih PMF izolovanih iz svih eksperimentalnih grupa tokom 24 sata pokazao je da nema promena u njihovoj vijabilnosti bez obzira da li su životinje imale povredu femoralnog nerva i da li su primile tretman (fiziološki rastvor ili vitamine B kompleksa) (grafik 17).

Imajući u vidu ove kao i rezultate *ex vivo* ispitivanja PMF svih eksperimentalnih grupa može se zaključiti da sama i.p. primena fiziološkog rastvora nije dovela do promene ni jedne *ex vivo* ispitivane karakteristike PMF, kao i da ne postoje razlike između intaktnih i lažno operisanih životinja za dalja *in vitro* ispitivanja funkcionalnih karakteristika PMF korišćene su samo lažno operisane, operisane i operisane B vitaminima tretirane životinje.

#### 4.3.5. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na fagocitoznu/pinocitoznu sposobnost peritonealnih makrofaga *in vitro*

Na grafiku 18 je prikazana sposobnost pinocitoze PMF izolovanih iz različitih grupa životinja odakle se može uočiti da je povreda femoralnog nerva dovela do smanjenja spontane i LPS-om stimulisane pinocitoze PMF, dok je tretman vitaminima B kompleksa nakon povrede uspeo da oporavi funkciju pinocitoze PMF izolovanih iz ove grupe životinja.



Grafik 18. Sposobnost pinocitoze obogaćene populacije peritonealnih makrofaga

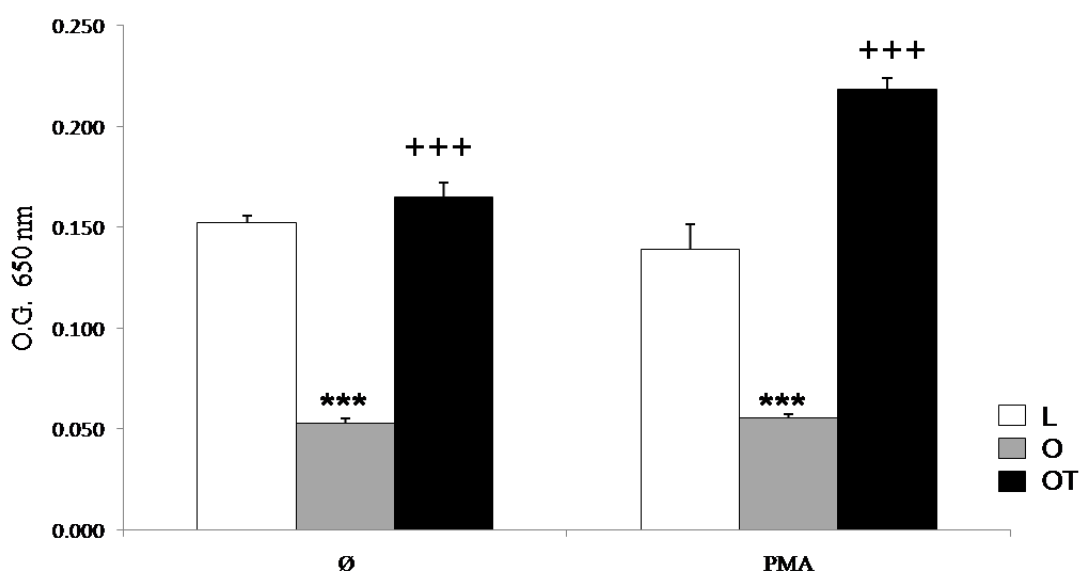
*Količina fagocitovanog Neutral red-a, kao pokazatelj pinocitozne sposobnosti aktiviranih makrofaga, merena je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana je sposobnost pinocitoze Neutral red-a in vitro nakon 24h bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SE vrednosti optičke gustine (O.G.).*

*\*\*\*  $p < 0.001$  vs lažno operisane*

*+++  $p < 0.05$  vs operisane*

#### **4.3.6. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost adhezije peritonealnih makrofaga *in vitro***

Rezultati testa adhezije za plastiku PMF *in vitro* kultivisanih tokom 24 sata su prikazani na grafiku 19 sa kog se uočava da je sposobnost spontane i PMA-indukovane adhezije PMF izolovanih iz različitih grupa životinja kojima je izvršena transekcija femoralnog nerva smanjenja u poređenju sa sposobnošću PMF koje su nakon transekcije i rekonstrukcije femoralnog nerva tretirane vitaminima B kompleksa.



Grafik 19. Sposobnost adhezije obogaćene populacije peritonealnih makrofaga *Intenzitet rastvorene boje (metilenskog plavog), koji je direktno srazmeran broju živih ćelija zalepljenih za plastiku, meren je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivan je*

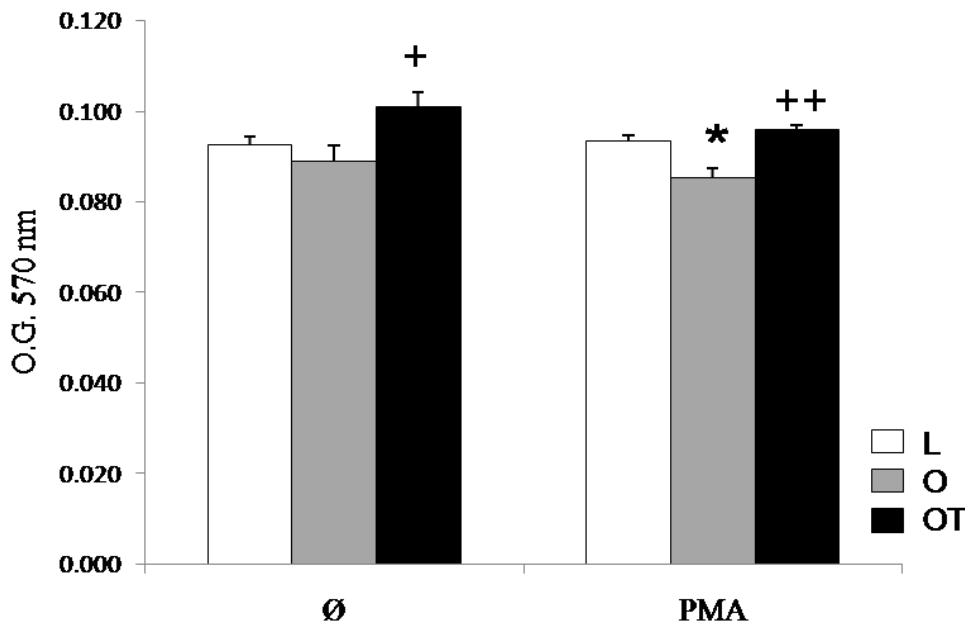
broj živih makrofaga zalepljenih za plastiku *in vitro* nakon 24h kultivacije bez (A) i u prisustvu stimulatora PMA-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti optičke gustine (O.G.).

\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane

+  $p < 0.05$  vs operisane

#### 4.3.7. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost produkcije reaktivnih oblika kiseonika od strane peritonealnih makrofaga *in vitro*

S obzirom da su prethodni testovi pokazali da je povreda nerva dovela do smanjenja i *ex vivo* i *in vitro* sposobnosti adhezije i fagocitoze, ispitane su i druge funkcionalne karakteristike PMF u *in vitro* uslovima među kojima je i sposobnost produkcije reaktivnih oblika kiseonika (ROS). Rezultati ispitivanja produkcije ROS su prikazani na grafiku 20.



Grafik 20. Sposobnost produkcije reaktivnih oblika kiseonika od strane obogaćene populacije peritonealnih makrofaga

*Količina redukovano NBT, proporcionalna količini superoksida produkovanog od strane aktiviranih makrofaga, merena je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana*

je sposobnost produkcije ROS-a *in vitro* nakon 24h kultivacije bez (A) i u prisustvu stimulatora PMA-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti optičke gustine (O.G.).

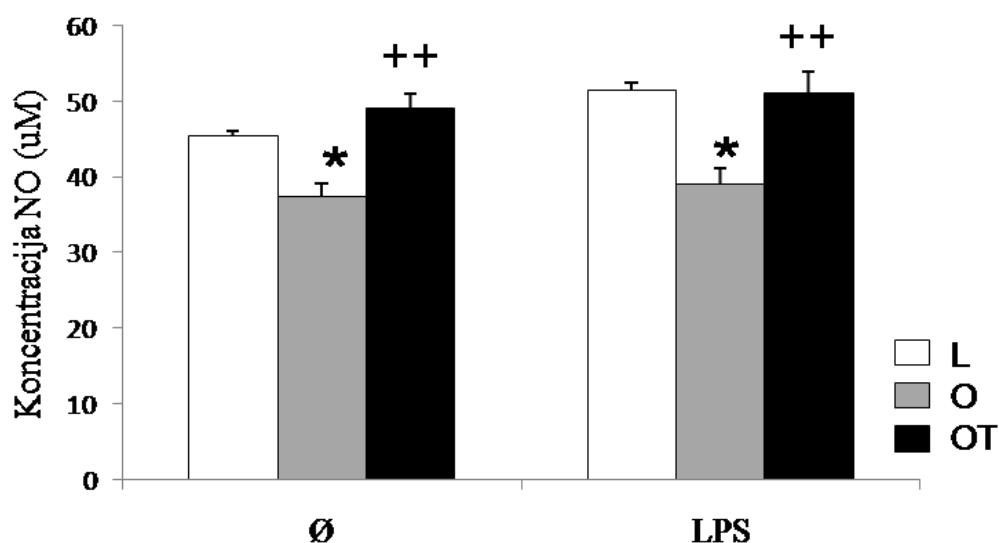
\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane

+  $p < 0.05$  vs operisane

Sa grafika 20 se uočava da povreda femoralnog nerva nije uticala na spontanu produkciju ROS, dok je dovela do smanjenja stimulisane produkcije ovih molekula. S druge strane, primena terapije vitaminima B kompleksa nakon povrede femoralnog nerva je dovela do povećanja produkcije ROS od strane PMF u poređenju sa PMF izolovanim iz operisanih netretiranih životinja.

#### **4.3.8. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost produkcije NO od strane peritonealnih makrofaga *in vitro***

Pored sposobnosti produkcije ROS ispitana je i sposobnost produkcije NO. Rezultati ovog testa su prikazani na grafiku 21 sa kog se uočava sličan trend kao i za produkciju ROS. Naime uočava se da je povreda femoralnog nerva dovela do smanjenja produkcije NO, dok je tretman vitaminima B kompleksa uspeo da oporavi funkciju PMF nakon povrede motorne grane femoralnog nerva i vrati je na nivo zabeležen kod lažno operisanih životinja.



Grafik 21. Koncentracija NO produkovana od strane obogaćene populacije peritonealnih makrofaga

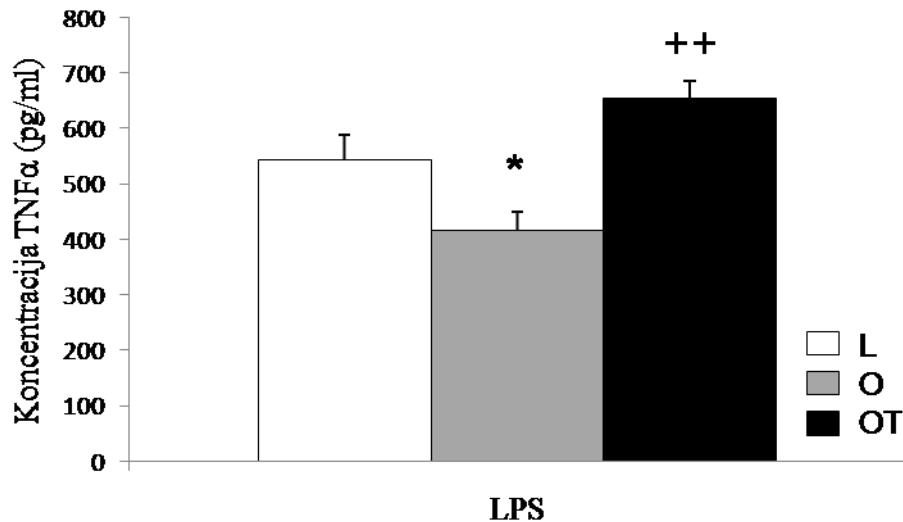
*Intenzitet rastvorene boje (smeše Griess-ovog reagensa), koji je proporcionalan količini oslobođenog NO, meren je pomoću ELISA spektrofotometra. Određivana je količina oslobođenog NO in vitro nakon 24h kultivacije bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti optičke gustine (O.G.).*

*\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane*

*+  $p < 0.05$  vs operisane*

#### **4.3.9. Efekat povrede femoralnog nerva i primenjene terapije vitaminima B kompleksa na sposobnost produkcije TNF- $\alpha$ i IL-10 od strane peritonealnih makrofaga *in vitro***

Na kraju je ispitana i sposobnost produkcije proinflamatornog citokina TNF- $\alpha$  i imunomodulatornog citokina IL-10. Rezultati ovih ispitivanja su prikazani na graficima 22 i 23.



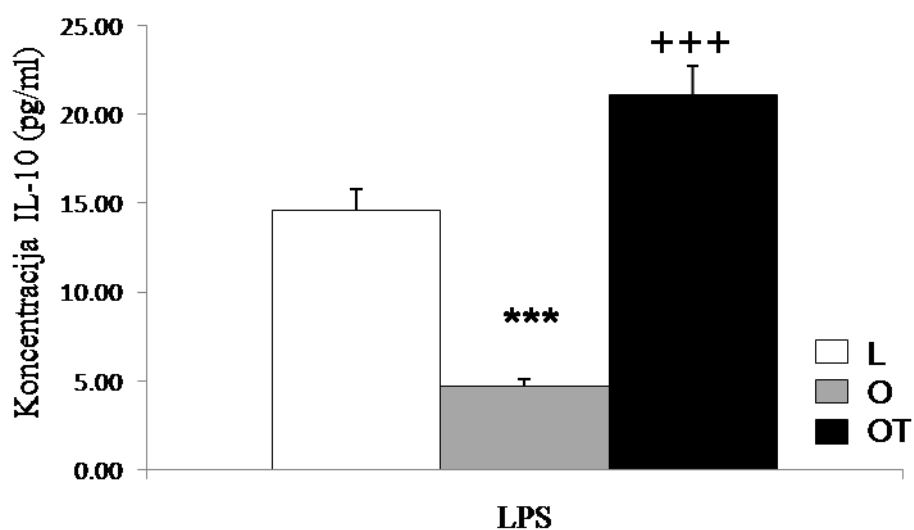
Grafik 22. Produkcija TNF- $\alpha$  u supernatantima kultivisanih ćelija obogaćene populacije peritonealnih makrofaga

*Količina produkovanog citokina je određivana ELISA testom i proporcionalna je intezitetu boje rastvora čija je apsorbanca merena pomoću ELISA spektrofotometra bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti količine citokina izražene u pg/ml*

*\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane*

*+  $p < 0.05$  vs operisane*

Sa ovih grafika se uočava da su PMF izolovani iz operisanih životinja su proizveli manju količinu TNF- $\alpha$  i IL-10 nakon 24 sata kultivacije *in vitro* u poređenju sa količinom detektovanom u supernatantima PMF lažno operisanih životinja. S druge strane, tretman vitaminima B kompleksa je doveo do normalizacije produkcije oba ispitivana citokina do nivoa detektovanog u supernatantima PMF lažno operisanih životinja.



Grafik 23. Produkcija IL-10 u supernatantima kultivisanih ćelija obogaćene populacije peritonealnih makrofaga

*Količina produkovanog citokina je određivana ELISA testom i proporcionalna je intezitetu boje rastvora čija je apsorbancija merena pomoću ELISA spektrofotometra bez (A) i u prisustvu stimulatora LPS-a (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE vrednosti količine citokina izražene u pg/ml*

*\*  $p < 0.05$  vs lažno operisane*

*+  $p < 0.05$  vs operisane*

## **5. DISKUSIJA**



Prisustvo sve većeg broja povreda perifernih nerava u savremenim društvima tokom kojih dolazi do denervacije usmerava naučnike ka istraživanju promena koje se dešavaju tokom procesa regeneracije povređenih perifernih nerava. S druge strane, denervacija se često koristi kao model za ispitivanje neuralne regulacije skeletnih mišića. Uprkos kapacitetu da se regenerišu, funkcionalni ishodi nakon nervnih povreda kod ljudi su veoma često nezadovoljavajući. Povrede perifernog nervnog sistema dovode do teških defekata pre svega u motornoj funkciji koja smanjuje kvalitet života, ali dovode i do psihičkih promena kod ljudi. Funkcionalni oporavak nakon povrede je određen stepenom ćelijskog oštećenja, i promenljivim faktorima koje podrazumevaju mesto povrede, vreme i primenjen način reparacije, stepen oštećenosti vezivnog tkiva koje okružuje nerv, narušavanje integriteta krvnih sudova, uzrastom i opštim zdravstvenim stanjem pacijenta (Hall, 2005). Stepem oporavka vrlo varira zavisno od obima i težine povrede, kao i od vremena koje je potrebno kako bi se aksoni regenerisali. Sposobnost regeneracije povređenog nerva i ćelije koje okružuju mesto povrede ne mogu da održavaju efektivnu promociju rasta tokom dužeg vremenskog perioda, a može doći i do stvaranja ožiljnog tkiva u kome je došlo do delimičnog oporavka nervnog tkiva bez ili sa delimično oporavljenom funkcijom. S obzirom da procesi regeneracije nerva i reinervacije mišića dugo traju, usled velike razdaljine i tačke povrede nerva i mesta inervacije mišića, može doći i do atrofije mišića i stvaranja fibrozog tkiva (Burnett i Zager, 2004). Generalno, nakon povrede tkiva aktiviraju se različiti ćelijski i molekularni mehanizmi koji uključuju promene fenotipa lokanih ćelija koje shodno tome određuju nivo oporavka tkiva (Gutner i sar., 2008). Stoga je najvažnije definisati molekularne mehanizme koji pojačavaju ili limitiraju regeneraciju, kao i ulogu pojedinih ćelija u odgovarajućim vremenskim periodima nakon povrede a sve u cilju boljeg razumevanja procesa regeneracije i razvoja potencijalno efikasnijih terapijskih pristupa. U skladu sa svim navedenim do sada ovo istraživanje je za cilj imalo ispitivanje značaja hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na oporavak funkcije motorne grane femoralnog nerva i posledični oporavak mišića kvadricepsa pacova. Ovaj model je veoma pogodan za funkcionalne analize procesa reparacije perifernih nerava jer nakon povrede ovog nerva dolazi do narušavanja funkcije jednog velikog mišića i prisustva jednostavnog motornog deficita.

## 5.1. REGENERACIJA MOTORNE GRANE FEMORALNOG NERVA

Povreda perifernog motornog nerva dovodi do značajnih fizioloških i biohemijskih promena koje se ogledaju u promeni funkcije mišića, ekstremiteta, odnosno dela tela, morfologiji i elektrofiziologiji nerva i skeletnog mišića, metabolizmu mišića kao i histološkim i imunskim karakteristikama nerva i mišića. Navedene promene se manifestuju kao smanjenje funkcionalnih sposobnosti, smanjenje mišićne mase, elektrofiziološke promene (EMG), promena tipa mišićnih vlakana, smanjenje koncentracije mitohondrija, povećanje protoka krvi u mirovanju, kao i promena nivoa bazalnog metabolizma (Higashino i sar., 2013; Borisov i sar., 2001). Takođe dolazi do promena u gustini ćelijskih jedara povređenog nerva i odgovarajućeg skeletnog mišića (Shea i sar., 2014).

Za procenu stepena oštećenja kao i kasnijeg oporavka mišića kvadricepsa nakon povrede motorne grane femoralnog nerva pacova, upotrebljen je test ponašanja opisan kao *Single frame motion analysis* (SFMA, Irintchev i sar., 2005; Irintchev, 2011). Test se zasniva na činjenici da nakon presecanja femoralnog nerva dolazi do ispada funkcije *m. quadriceps*-a i nemogućnosti ekstenzije kolena prilikom kretanja. Funkcija *m. quadriceps*-a se određuje na osnovu merenja ugla (engl. *foot-base angle*, FBA) koji formiraju stopalo pacova i podloga u trenutku odvajanja stopala od podloge. Povećanje vrednosti ugla se uočava prilikom odvajanja prstiju od podloge kada dolazi do unutrašnje rotacije stopala (palac rotiran ka unutra) dovodeći do povećanja FBA što ukazuje na potpuni ili delimični ispad funkcije *m. quadriceps*-a. Kao i kod ljudi, ispad funkcije *m. quadriceps*-a, koji predstavlja jedini ekstenzor zgloba kolena, dovodi do nemogućnosti da se podrži težina tela tokom faze oslonca na povređeni ekstremitet što je neophodno za zamah kontralateralne noge tokom hodanja. Povećano opterećenje na povređeni ekstremitet u fazi oslonca izaziva abnormalno savijanje u zglobu kolena, podizanje pete i unutrašnju rotaciju šape. Neposredno nakon povrede, prvog postoperativnog dana, vrednosti ugla su značajno povišene u odnosu na preoperativne što govori u prilog kompletnog ispada funkcije *m. quadriceps*-a. Vrednosti ugla postepeno opadaju tokom vremena pa se 60. dana približavaju vrednostima za kontralateralni ekstremitet. Smanjenje ugla ukazuje na oporavak funkcije *m.*

*quadriceps*-a, odnosno, reinervaciju mišića uz ponovno uspostavljanje ekstenzije kolena u određenom stepenu što dovodi do mogućnosti oslanjanja na povređeni ekstremitet.

Za razliku od vrednosti ugla, koje su povećane neposredno po nastanku traume, vrednosti atrofije mišića ne pokazuju značajan pad tokom prvih dana nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva kod pacova. Značajnije vrednosti atrofije, izražene kao procenat smanjenja mase mišića u odnosu na zdravi, kontralateralni mišić, primećene su sedmog postoperativnog dana. Atrofija postaje izraženija tokom 14. dana i svoj maksimum dostiže 21. dana nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva. Ovakav nalaz može se objasniti činjenicom da je potrebno vreme da se u denervisanom mišiću dogode promene koje će dovesti do atrofije mišićnih vlakana i na kraju do smanjenja mišićne mase. Kao što je poznato, atrofija je uzrokovana smanjenim nivoom transkripcije i translacije u mišićnim vlaknima (ćelijama) denervisanog mišića. Snižen nivo sinteze i povišen nivo degradacije miofibrilarnih proteina dovodi do smanjenja mišićne mase (Higashino i sar., 2013; Quan i Bird, 1999). Povećanje vrednosti mišićne mase može se približiti preoperativnim vrednostima čak i kada je broj regenerišućih aksona manji u odnosu na broj aksona pre povrede, zato što svaki regenerišući akson ima sposobnost da reinerviš četiri do pet puta veći broj mišićnih vlakana nego što je uobičajeno da bi se kompenzovao smanjeni broj aksona koji su uspešno reinervisali denervisani mišić (Rafuse i Gordon, 1996). Oporavak mišićne mase se dešava u dužem vremenskom periodu nakon reinervacije i postizanja određenog funkcionalnog oporavka pošto je potrebno vreme (kao i za razvoj atrofije) da se aktiviraju ćelijski mehanizmi koji će dovesti do povećanja sinteze miofibrilarnih proteina i posledično do uvećanja mišićne mase.

Elektrodijagnostička (EMG) ispitivanja predstavljaju objektivni i kvantitativan način ispitivanja motorne funkcije. Direktno upoređivanje akcionih potencijala može biti korisno u proceni razlika u stepenu nervne regeneracije (Wood i sar., 2011). Poznato je da povređeni aksoni zadržavaju određeni stepen provodljivosti tokom nekoliko dana nakon povrede, sve dok ne dođe do njihove degeneracije i posledične degradacije. Kod čoveka, motorni aksoni ostaju podražljivi do sedam dana nakon povrede (Quan i Bird, 1999). Najniže vrednosti EMG-a u ovom istraživanju su zabeležene sedmog dana od povrede, nakon čega dolazi do postepenog povećanja

vrednosti EMG u odnosu na kontralateralni ekstremitet. Značajan oporavak je zabeležen 30-60 dana kada se vrednosti EMG denervisanog mišića približavaju vrednostima kontralateralnog, zdravog, mišića. Vrednosti EMG pokazuju rast paralelno sa funkcionalnim oporavkom životinja procenjenim testom hodanja (smanjenje FBA) što ukazuje da je EMG pouzdan parametar oporavka nerva, odnosno mišića, pošto ukazuje na funkcionalno stanje mišića. S druge strane, prisutan je pad vrednosti EMG u periodu kada još uvek nema znakova atrofije mišića neposredno nakon povrede pošto je za razvoj atrofije potrebno vreme. Tek u kasnijem periodu oporavka, odnosno od 60. dana dolazi do paralelnog oporavka vrednosti FBA, EMG-a, kao i oporavaka mišićne mase (smanjenje stepena atrofije u odnosu na kontralateralni mišić).

Gustina ćelijskih jedara motorne grane femoralnog nerva distalno od mesta transekcije i suture se značajno povećava u periodu nakon povrede. Ovaj podatak je u korelaciji sa ranije objavljenim člancima koji se tiču reakcije perifernog nerva na povredu (Shea i sar., 2014). Povećana gustina jedara u povređenom segmentu nerva je rezultat proliferacije Švanovih ćelija, infiltracije neutrofilima kao i aktivacije rezidentnih makrofaga i migracije monocita iz cirkulacije i njihovog diferencijacije u tkivne makrofage (Shea i sar., 2014). Najveće povećanje gustine jedara beleži se u trećem danu nakon povrede i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva. Visoke vrednosti gustine ćelijskih jedara se održavaju tokom sedmog i 14. dana od povrede, uz manji pad u odnosu na treći dan. Možemo pretpostaviti da je u ovom periodu infiltracija neutrofilima i aktivacija tkivnih makrofaga, odnosno regrutovanje makrofaga iz cirkulacije odgovorno za značajno povećanje gustine ćelijskih jedara, kao odgovor na traumu. Švanove ćelije u ranoj fazi regeneracije ne proliferišu već neposredno nakon denervacije, odnosno nakon gubitka kontakta sa aksonom, ulaze u fazu degeneracije, gube mijelin i dediferenciraju se.

Ispitivanjem imunoreaktivnosti za MBP i S100 protein primećeno je da se trećeg dana nakon traume u značajnoj meri narušava struktura nerva kao i morfologija Švanovih ćelija u smislu njihove dediferencijacije uz prisustvo razgrađenog mijelina usled degradacije mijelinskog omotača. Navedene promene su posledica degeneracije aksona što dovodi do gubitka kontakta između Švanovih ćelija i aksona i njihove denervacije distalno od mesta povrede što je u skladu sa literaturnim podacima (Gaudet i sar., 2011). Tek u kasnijoj fazi, nakon reinervacije, odnosno ponovnog uspostavljanja

kontakta sa proliferišućim aksonom, dolazi do ponovne diferencijacije Švanovih ćelija i njihove proliferacije. Pojačana imunoreaktivnost za MBP i S100 protein u sedmom, odnosno 14. danu nakon povrede je u sklopu procesa ponovne diferencijacije Švanovih ćelija u zrele forme. Od 21. postoperativnog dana imunoreaktivnost za MBP, kao pokazatelj debljine mijelinskog omotača, se ujednačava. Takođe, broj Švanovih ćelija koji je sličan vrednostima kod lažno operisanih životinja i vrednostima u kontralateralnoj intaktnoj motornoj grani femoralnog nerva. Dvojno imunofluorescentno obeležavanje je pokazalo kolokalizaciju S100 i MBP što upućuje na prisustvo mijelina u Švanovim ćelijama tokom formiranja mijelinskog omotača. S obzirom na navedeno, broj Švanovih ćelija raste u kasnijoj fazi oporavka, tokom prorastanja regenerišućih aksona i tada one učestvuju u povećanju gustine ćelijskih jedara. S druge strane, konstantan pad celularnosti nakon 14. dana ukazuje na značajno smanjenje infiltracije neutrofilima i makrofagima 14 dana nakon povrede, što odgovara završetku degradacione faze Valerijanove degeneracije i početku reorganizacije distalnog nervnog segmenta za prihvatanje regenerišućih aksona. Smanjenje mišićne atrofije je u pozitivnoj korelaciji sa smanjenjem gustine ćelijskih jedara u motornom nervu. Ovaj nalaz se može objasniti podacima Medisona i saradnika koji su pokazali da mišić oslobađa trofičke faktore koji predstavljaju i najpotentnije faktore regulacije regeneracije nervnog tkiva (Madison i sar., 2009). Za procenu rasta aksona tokom ispitivanog perioda oporavka praćena je ekspresija GAP-43 kao markera rasta aksona. Normalan obrazac imunoreaktivnosti se uočava prvog dana nakon povrede i sličan je onom koji se detektuje u lažno operisanim životinjama i kontralateralnim nervima operisanih životinja. Pad imunoreaktivnosti je uočen od trećeg do 14. postoperativnog dana što ukazuje se procese degeneracije aksona. Povećanje imunoreaktivnosti se detektuje 21. dana što može biti posledica izrastanja regenerišućih aksona, ali se delom može objasniti i prisustvom GAP-43 u Švanovim ćelijama (Gu i sar., 2015). Od 30. dana se uočava veći broj sitnijih i manji broj krupnijih aksona, dok je u 90. i 120. danu smanjen broj aksona manjeg dijametra i povećan broj aksona većeg dijametra. Navedeni podaci su u skladu sa saznanjem da je u početnoj fazi regeneracije povećan broj aksona manjeg dijametra kao rezultat pojačanog aksonalnog kolateralnog grananja na mestu povrede i manjeg dijametra Bungerovih prostora dok se u kasnijoj fazi regeneracije favorizuju aksoni većeg dijametra u odnosu na aksone manjeg dijametra koji podležu

degeneraciji. Ovi rezultati su u skladu i sa rezultatima drugih autora (Liao i sar., 2013) koji su pokazali da tokom vremena dolazi do sazrevanje urastajućih aksona u cilju ostvarivanja efektne neuromuskularne veze. Efekat sazrevanja verovatno uključuje eliminaciju aksona koji su ostvarili slabu ili nikakvu neuromuskularnu vezu.

Gustina ćelijskih jedara mišića inervisanih povređenim i rekonstruisanim nervom pokazuje značajno povećanje u odnosu na mišić inervisan nepovređenim nervom tokom postoperativnog perioda, već od trećeg dana nakon povrede sve do 21. dana kada beleži najviše vrednosti. Povećanje celularnosti denervisanog mišića može se objasniti činjenicom da denervisani mišić ispoljava kompenzatorni odgovor formirajući nova mišićna vlakna porekla satelitskih ćelija koje se nalaze na površini mišićnih vlakana kod kojih se razvio određeni stepen atrofije (roditeljske ćelije) ili unutar bazalnih lamina odumrlih mišićnih vlakana (Borisov i sar., 2001). Trend smanjenja gustine ćelijskih jedara mišića se nastavlja u daljem toku oporavka sve do 120. dana. Smanjenje gustine ćelijskih jedara ukazuje na smanjen kompenzatorni mišićni odgovor, tj. smanjeno formiranje novih mišićnih vlakana, kao rezultat uspešne reinervacije mišića, pošto oporavak mišića zavisi od uspostavljanja neuromuskularnog spoja (Badke i sar., 1989). Gustina jedara *m. quadricepsa* pozitivno korelira sa gustinom jedara motorne grane femoralnog nerva tokom perioda oporavka. Oporavak nervnog i mišićnog tkiva međusobno je zavisian, ali tačan obrazac tog uzajamnog odnosa i zavisnosti još uvek nije jasno definisan. Takođe, postoji pozitivna korelacija između smanjenja gustine ćelijskih jedara mišića, smanjenja atrofije mišića kao i smanjenja FBA vrednosti što govori u prilog uspešnog oporavka funkcije *m. quadricepsa*-a. S druge strane, uočili smo negativnu korelaciju između gustine ćelijskih jedara mišića i povećanja EMG vrednosti.

## **5.2. EFEKAT TERAPIJE VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA REGENERACIJU MOTORNE GRANE FEMORALNOG NERVA**

Kao što je ranije pomenuto, poznato je da su vitamini B kompleksa važni za normalno funkcionisanje nervnog sistema, kako centralnog, tako i perifernog. Najviše pozitivnih efekata na regeneraciju perifernog nerva, pogotovo oporavak motorne funkcije je zabeležen kod primene analoga vitamina B12 , metilkobalamina (Liao i sar.,

2010), ali i drugi vitamini (B1, B6) su takođe ispitivani u ranijim studijama i uglavnom su ispoljili pozitivne efekte (Bubko i sar., 2015; Turan i sar., 2014; Fujji i sar., 1996). U ovom radu je pokazano da je primenjena terapija vitaminima B kompleksa u neposrednom postoperativnom periodu dovela do poboljšanja regeneracije motorne grane femoralnog nerva što se manifestovalo boljim/bržim oporavkom mišića kvadricepsa.

Eksperimentalna grupa operisanih životinja koja je svakodnevno od dana operacije tretirana vitaminima B kompleksa je ispoljila bolji oporavak, odnosno veće smanjenje vrednosti FBA tokom prvih 14 dana u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu, s tim da je ta razlika bila statistički značajna u 14. danu oporavka. Na osnovu ovoga se može zaključiti da je terapija vitaminima B kompleksa dovela do ubrzanog oporavka funkcije *m. quadriceps*-a pacova nakon denervacije, odnosno da je primenjena terapija umanjila efekat denervacije u smislu smanjenja broja mišićnih vlakana koja su podlegla procesu atrofije ili odumiranja.

Kada se posmatra atrofija mišića inervisanog rekonstruisanom motornom granom femoralnog nerva nije primećeno značajno smanjenje mišićne mase operisanih životinja (kako tretiranih tako i netretiranih) tokom prvih tri dana nakon povrede. Može se reći da je ovakav rezultat i očekivan i posledica je promena u metabolizmu denervisanog mišića koje su komentarisane ranije. Značajna razlika između operisanih i kontrolnih životinja je primećena sedmog postoperativnog dana ali razlika između tretiranih i netretiranih životinja, iako prisutna (manji stepen atrofije kod tretiranih životinja) nije značajna. Trend povećanja atrofije se nastavlja i 14. postoperativnog dana, ali nema značajne razlike između grupe životinja tretirane vitaminima B kompleksa i netretiranih životinja.

EMG vrednosti zabeležene kod operisanih i vitaminima B kompleksa tretiranih životinja pokazuju isti obrazac promena kako za tretirane tako i za netretirane životinje, odnosno pad vrednosti unutar prvih sedam dana od povrede i rekonstrukcije termino-terminalnom anastomozom, uz znake oporavka u vrednosti ovog parametra u 14. postoperativnom danu. Zabeležena je značajna razlika u vrednostima EMG-a kod životinja tretiranih vitaminima B kompleksa u odnosu na netretirane što je u skladu sa rezultatima funkcionalnog oporavka procenjivano testom hodanja kojim se u istom vremenskom periodu detektuje značajno smanjenje FBA vrednosti kod tretiranih

životinja.

Može se pretpostaviti da su svi do sada diskutovani efekti vitamina B kompleksa na bolji oporavak funkcije *m. quadriceps*-a najvećim delom posledica delovanja terapije vitaminima B kompleksa na regeneraciju motornog nerva što posledično dovodi do pozitivnog efekta i na sam mišić smanjenjem gustine ćelijskih jedara. Smanjenje gustine ćelijskih jedara u mišiću se može objasniti kraćim i manje intenzivnim procesom denervacije kod operisanih i tretiranih životinja.

Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Liao-a i saradnika koji su u svojim radovima (2010, 2013) pokazali da primena analoga vitamina B12, metilkobalamina, u postoperativnom periodu poboljšava oporavak perifernog nerva nakon povrede i rekonstrukcije. Rezultati ove grupe istraživača ukazuju na značajno povećanje vrednosti akcionih potencijala u grupi životinja tretiranih vitaminom B12 u odnosu na ostale netretirane ili drugim terapeutičima tretirane životinje. Takođe, pokazali su i da tretman vitaminom B12 povećava broj regenerišućih aksona tokom ranog postoperativnog perioda usled pojačanog kolateralnog grananja u distalnom delu nerva na šta ukazuju povećane vrednosti GAP-43 (u kasnijoj fazi, tokom tri meseca, dovodi do smanjenja broja aksona) kao i povećanja dijametra aksona i debljine njihovog mijelinskog omotača. Broj funkcionalnih motornih ploča se povećava u mišiću koji je inervisan nervom kod životinja tretiranih vitaminom B12 unutar prvog meseca od povrede nerva. Takođe je pojačana ekspresija S-100 proteina na Švanovim ćelijama u regenerativnom periodu što je rezultat povećane aktivnosti Švanovih ćelija pre nego njihovog broja. U skladu sa ovim literaturnim nalazima su i naši rezultati koji su pokazuju smanjenje imunoreaktivnosti za S100 protein prvog dana nakon povrede u grupi samo operisanih (O) i grupi operisanih i tretiranih životinja (OT) u poređenju sa lažno operisanim životinjama (L). Potom se trećeg dana nakon povrede uočava pojačana imunoreaktivnost u grupi samo operisanih životinja što ukazuje na prisustvo dediferenciranih Švanovih ćelija dok se kod operisanih i tretiranih životinja (OT) uočava prisustvo srpastih mijelinizirajućih Švanovih ćelija. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da je terapija vitaminima B kompleksa uticala na smanjenje stepena dediferencijacije Švanovih ćelija nakon povrede a moguće i brži oporavak dediferenciranih Švanovih ćelija. U prilog ove hipoteze govori i rezultat dobijen sedmog dana oporavka u kome se kod vitaminima B kompleksa tretiranih životinja uočavaju



srpaste Švanove ćelije koje u tom terminu nisu detektovane kod operisanih životinja koje nisu primale terapiju. Srpaste ćelije se pojavljuju u grupi operisanih životinja 14. tog dana dok se u tom periodu imunoreaktivnost za S100 protein u grupi operisanih i tretiranih životinja vraća na nivo lažno operisanih. Navedene rezultate možemo tumačiti efektom vitamina B kompleksa u smislu smanjenja degradacije mijelina i dediferencijacije Švanovih ćelija što dovodi do brže rediferencijacije Švanovih ćelija u perifernom motornom nervu nakon transekcije i rekonstrukcije. Sličan rezultat u svojim istraživanjima dobili su Liao i saradnici (2010). Oni su pokazali da primena metilkobalamina podiže nivo metabolizma Švanovih ćelija (pojačana ekspresije S100 proteina) što rezultuje ubrzanom aksonalnom regeneracijom i pojačanom mijelinizacijom. Mesec dana nakon povrede perifernog nerva na mestu povrede je detektovana minimalna aktivnost makrofaga (niske ekspresija CD68 pozitivnih ćelija) što ukazuje da je većina ćelija u tom periodu već uključena u regeneraciju, tj. da je proces degeneracije završen. Poznato je i da metilkobalamin promoviše aksonalni transport i regeneraciju (Yamatsu i sar., 1976). Deluje kao kofaktor enzima metionin sintetaze koji vrši transfer metil grupe u regeneraciji metionina iz homocisteina. Povećanje koncentracije metionina, koji se može metabolisati u acetilholin, povećava nivo acetilholina u aksonima i postsinaptičkim acetilholinskim receptorima i olakšava razvoj i sazrevanje neuromuskularne ploče (Vasilescu i Florescu, 1982). Pretpostavlja se da ovaj mehanizam pomaže regenerišućim aksonima da ostvare i ojačaju kontakt sa ciljnim tkivom.

Pored navedenog, analog vitamina B12, metilkobalamin, ubrzava mijelinizaciju perifernog aksona promocijom sinteze fosfolipida koji predstavljaju glavni konstituent mijelinskog omotača. Metilkobalamin ubrzava aksonalnu regeneraciju i mijelinizaciju a takođe podiže nivo metabolizma Švanovih ćelija. Primećena je povećana ekspresija S-100 proteina u Švanovim ćelijama što ukazuje na povećane ćelijske aktivnosti kao što su fosforilacija proteina, enzimska aktivnost, diferencijacija ćelija i citoskeletalna dinamika (Donato, 1999). Takođe je identifikovana S-100 imunoreaktivnost unutar velikih, regenerišućih aksona. Pokazali smo da je imunoreaktivnost za MBP promenjena u grupama operisanih životinja u odnosu na lažno operisane kao i da postoje značajne razlike između grupe samo operisanih (O) i operisanih i tretiranih (OT) životinja. Na osnovu imunoreaktivnosti za MBP u prvom postoperativnom danu možemo zaključiti

da je terapija vitaminima B kompleksa smanjila propadanje i degradaciju mijelinskog omotača neposredno nakon povrede. Ovakav inhibitorni efekat terapije vitaminima B kompleksa na degradaciju mijelinskog omotača se zadržava u trećem postoperativnom danu kada se u ovoj grupi životinja uočava kružna imunoreaktivnost za MBP. Navedeni podaci ukazuju da nije došlo do značajne razgradnje mijelina u grupi OT životinja pod uticajem terapije vitaminima B kompleksa. Odsustvo kolokalizacije imunoreaktivnosti za S100 i MBP u trećem i sedmom danu u grupi O životinja ukazuje na prisustvo dediferenciranih nemijelinizirajućih Švanovih ćelija i razgrađenog mijelina. Kolokalizacija u navedenoj grupi se uočava tek 14. dana. S druge strane, terapija vitaminima B kompleksa dovodi do kolokalizacije u svim ispitivanim terminima sa većim prisustvom Švanovih ćelija trećeg i sedmog dana, dok se 14. dana broj Švanovih ćelija izjednačava sa grupom lažno operisanih životinja. Poznato je i da metilkobalamin povećava broj urastajućih aksona distalno od mesta povrede unutar prvog meseca kao i u blizini zone motorne ploče. Kasnije, smanjuje suvišni broj aksona u korist aksona većeg dijametra. Takođe blago povećava količinu krvnih sudova (verovatno posledica povećanog metabolizma zbog procesa regeneracije). Povećava dijametar aksona i debljinu mijelinskog omotača regenerišućih aksona (Liao i sar., 2013) i tako pomaže sazrevanje aksona. Pored navedenih efekata, Fujii i saradnici (1996) su dokazali da vitamini B1, B6, kao i B12, povećavaju brzinu sprovođenja impulsa kroz nerv (mehanizmom smanjene degeneracije aksona u akrilamid izazvanoj neuropatiji kod pacova nakon tretmana vitaminima B kompleksa) kao i da pojačavaju izrastanje regenerišućih aksona.

Grupa životinja koja je tretirana vitaminima B kompleksa u neposrednom postoperativnom periodu je pokazala manje izraženu gustinu ćelijskih jedara motorne grane femoralnog nerva distalno od mesta povrede u odnosu na grupu operisanih a netretiranih životinja. Ona je bila značajno veća od gustine ćelijskih jedara kod lažno operisanih životinja, što je očekivano s obzirom na procese Valerijanove degeneracije i posledične regeneracije nerva nakon traume (Gaudet i sar., 2011). Najizraženija razlika u gustini ćelijskih jedara nerva između tretiranih i netretiranih životinja uočena je trećeg i 14. postoperativnog dana, sa statistički značajnim razlikama. Spomenuli smo da je u prvim danima nakon povrede u delu perifernog nerva distalno od lezije izražena inflamatorna reakcija u sklopu Valerijanove degeneracije, u vidu infiltracije neutrofila,

kasnije i makrofaga/monocita, u cilju uklanjanja degenerisanih aksona i debrisa mijelina. Infiltrativna faza je najizraženija prvih sedam dana. S druge strane poznato je da 30. dana od povrede većinu ćelija u distalnom nervnom segmentu predstavljaju Švanove ćelije (Liao i sar., 2013). Dosadašnja istraživanja su pokazala da antiinflamatorne supstance imaju ulogu u poboljšanju procesa regeneracije nakon traume perifernog nerva (Liao i sar., 2010) i kičmene moždine (Bao i sar., 2004). Može se pretpostaviti da je smanjenje gustine ćelijskih jedara nakon primenjene hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa u postoperativnom periodu takođe rezultat smanjenog nivoa inflamacije. Takođe, moguće je da je terapija B kompleksom smanjila dediferencijaciju Švanovih ćelija i degradaciju mijelina. Posledično, smanjena proliferacija Švanovih ćelija može rezultovati smanjenom gustine ćelijskih jedara u motornoj grani femoralnog nerva.

Gustina ćelijskih jedara mišića pokazuje sličan trend. Ona predstavlja indirektni pokazatelj oštećenja mišićnog tkiva (Shea i sar., 2014). Neposredno nakon traume dolazi do značajnog povećanja gustine ćelijskih jedara mišića kvadricepsa inervisanog rekonstruisanim nervom, kako u grupi tretiranih tako i u grupi netretiranih životinja. Razlike su statistički značajne od trećeg dana pa do kraja ispitivanog perioda oporavka. Gustina ćelijskih jedara tretiranih životinja manja je od gustine ćelijskih jedara netretiranih životinja, ali ta razlika za treći i sedmi dan oporavka nije statistički značajna. Značajna razlika između tretiranih i netretiranih životinja se uočava 14. dana, sa manjim vrednostima kod grupe tretiranih. Na osnovu ranijih saznanja Borisova i saradnika (2001) koja smo prethodno komentarisali znamo da je povećana gustine ćelijskih jedara mišića posledica kompenzatornog miogenog odgovora u smislu stvaranja novih mišićnih vlakana kao odgovor na denervaciju. Niži nivo celularnosti u grupi tretiranih životinja ukazuje na manji broj denervisanih mišićnih vlakana koja će razviti atrofiju ili ćelijsku smrt. Ovaj nalaz upućuje na zaključak da je smanjeni kompenzatorni mišićni odgovor (u vidu proliferacije i diferencijacije satelitskih ćelija u nove mioblaste) posledica smanjenog nivoa denervacije mišića kvadricepsa zbog poboljšanog procesa regeneracije motorne grane femoralnog nerva i skraćanja vremena denervacije, kao posledice terapije vitaminima B kompleksa.

### **5.3. EFEKAT POVREDE FEMORALNOG NERVA I TERAPIJE VITAMINIMA B KOMPLEKSA NA PERITONEALNE MAKROFAGE**

Imunski sistem štiti organizam od infekcije različitim mikroorganizmima kroz koordinirano delovanje njegovih komponenti. S druge strane, osobe i životinje koje se podvrgavaju hirurškim intervencijama i anesteziji pokazuju promene u imunskom odgovoru za koje je teško utvrditi da li su indukovane stresom izazvanim hirurškom procedurom ili primenom lekova za anesteziju. Poznato je da sama hirurška incizija indukuje lokalnu povredu tkiva, uključujući krvne sudove i aferentne nerve što dovodi do aktivacije HPA ose. Posledično aktivacija HPA ose dovodi do nastanka molekula, CRH, ACTH i kortizola, koji ispoljavaju efekat na imunski sistem. Pored njih i kateholamini imaju uticaj na imunski sistem (Chen i sar., 2010).

Rezidentni tkivni makrofagi igraju centralnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva i imunskom nadzoru. Makrofagi su ključni za održavanje homeostaze tkiva jer doprinose inicijaciji, napredovanju i rezoluciji inflamacije nakon infekcije ili povrede tkiva (Lavin i Merad, 2013). Populacija makrofaga je veoma heterogena što odražava adaptaciju ovih ćelija na različite sredine u različitim tkiva i njihove specijalizovane funkcije. U inflamatornim stanjima dolazi do delimičnog ili potpuno uklanjanja populacije rezidentnih makrofaga koja će se potom obnoviti angažovanjem monocita periferne krvi ili lokalnom proliferacijom postojećih tkivnih makrofaga (Davies i sar., 2013). Poznato je da je peritonealna šupljina jedinstvena sredina u kojoj se dolazi do proliferacije, diferencijacije i aktivacije rezidentnih peritonealnih makrofaga (PMF) pa su stoga ove ćelije veoma koristan model sistem za bolje razumevanje ove ćelijske dinamike. Danas je poznato da veliki broj molekula, kao i različita promenjena stanja (retinoična kiselina, molekuli koji nastaju kao posledica aktivacije HPA ose, stres, starenje) utiču na fenotipske i funkcionalne karakteristike PMF. Osim toga, razumevanje različitog razvojnog porekla mnogih populacija tkivnih makrofaga, uključujući njihovu potrebu za obnavljanjem u homeostazi i različitim patološkim stanjima, će pružiti uvid u osnovne razlike između upalnih monocita poreklom iz makrofaga i njihovih tkivnih rezidentnih "rođaka".

Imajući u vidu podatke o uticaju hirurške traume na imunski sistem, poslednji

cilj ovog rad je bio da se ispita efekat hirurške transekcije i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva na fenotipske i funkcionalne karakteristike PMF i uticaj terapije vitaminima B kompleksa na pomenute karakteristike. Poznato je da su PMF ćelije sa mnogobrojnim funkcijama koje su u osnovi njihove proinflamatorne, efektorske i imunoregulatorne aktivnosti. Stoga je određivana produkcija reaktivnih oblika kiseonika i azot oksida, kao važnih parametara efektorske aktivnosti i sposobnost fagocitoze i produkcije TNF- $\alpha$ , adhezija za plastiku i ekspresija adhezivnih molekula relevantnih za ovaj proces, kao pokazatelja proinflamatorne aktivnosti. Sposobnost produkcije IL-10 je procenjivana kao mera imunoregulatorne aktivnosti PMF. Sve navedene aktivnosti i karakteristike PMF operisanih životinja su upoređene sa istim u populaciji PMF operisanih i vitaminima B kompleksa tretiranim životinja. Rasvetljavanje uloge i karakteristika PMF u uslovima različitih vrsta traume uključujući i traumatu perifernih nerava je važno za razumevanje uloge ovih ćelija u održavanju regionalne homeostaze, ali i razumevanje samih mehanizama kojima trauma sistemski deluje na organizam uključujući PMF.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da transekcija i rekonstrukcija motorne grane femoralnog nerva ne dovodi do promene u broju i vijabilnost ukupnih ćelija peritonealne šupljine, kao i da ne utiče na procentualnu zastupljenost pojedinačnih subpopulacija u ukupnim peritonealnim ćelijama. Na osnovu ovoga se može zaključiti da povreda perifernog nerva nije dovela do uklanjanja ili infiltracije novih ćelija sedam dana nakon povrede ili u slučaju da su se promene dešavale neposredno nakon povrede pretpostavka je da su se ispitivane funkcije vratile na normalu. Dalje je pokazano da ni primena terapije vitaminima B kompleksa u ispitivanom periodu, sedmog dana nakon povrede, nije uticala na promenu broja, vijabilnosti i procentualnu zastupljenosti subpopulacija u ukupnim peritonealnim ćelijama. Ograničenje ovog dela istraživanja koja se odnose na PMF je upravo činjenica da je korišćen samo jedan termin te da nemamo dinamiku promena od samog trenutka povrede do ovog ispitivanog termina. Stoga je neophodno u budućim istraživanjima obuhvatiti i ispitivanja uticaja povrede perifernog nerava u ranijim terminima s obzirom da postoji mogućnost da su se neke promene u peritoneumu desile ali u ranijem periodu oporavka.

U cilju dobijanja što preciznijih rezultata o efektu povrede perifernog nerva na PMF izvršeno je obogaćivanje populacije PMF na gradijentu gustine pa je za sva druga

funkcionalna i fenotipska ispitivanja korišćena upravo obogaćena populacije PMF u kojoj je preko 85% ćelija bilo CD68 pozitivno. Rezultati ovog dela istraživanja govore o tome da se obogaćena populacija PMF izolovana nakon sedam dana nakon transekcije i rekonstrukcije motorne grane femoralnog nerva karakteriše smanjenim *ex vivo* vrednosti ispitivanih funkcionalnih karakteristika uključujući sposobnost fagocitoze i adhezije, produkcije ROS, NO, TNF- $\alpha$  i IL-10. Smanjena oksidativna aktivnost PMF merena produkcijom ROS je u skladu sa rezultatima Lopeza i saradnika (2012) koji su pokazali da nakon teške opekotine u periodu nakon 24 sata od povrede PMF pokazuju smanjenu sposobnosti proinflatornog reagovanja u smislu produkcije ROS na dodatnu stimulaciju LPS-om. Bez obzira na to što je u našem ispitivanju korišćen model povrede perifernog nerva koja se ne karakteriše intenzivnim sistemskim odgovorom kao opekotina može se pretpostaviti da se nakon povrede perifernog nerva sa PMF dešava slična promena. Povreda perifernog nerva dovodi do sistemskih efekata koji se ogledaju u promeni funkcionisanja ose hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HPA ose) što može imati uticaj na funkcionalne i fenotipske karakteristike PMF (Jeffrey i Underhill, 1995). Ovakav *ex vivo* nalaz smanjenih PMF funkcija mogao bi da se objasni imunosupresivnim efektom povrede perifernog nerva na ispitivane funkcije PMF sedam dana nakon traume. U prilog indukcije imunosupresije hirurškom transekcijom i rekonstrukcijom perifernog nerva idu i nalazi da je imunosupresija i povećana osetljivost na infekciju jedna od najznačajnijih komplikacija povezanih sa termičkom povredom (15, 16, 18, 21), kao i drugim oblicima traume. Mehanizmi kojima termička povreda izaziva imunosuprimirano stanje su kompleksni, uključujući aktivnost ciklooksigenaze (27-29), glukokortikoida (30) i supresije funkcije T ćelija (31, 32). Buduća istraživanja bi trebalo da budu usmerena ka definisanju sistemskih faktora koji bi mogli biti odgovorni za uočen fenomen. Potrebno je ispitati HPA osu odnosno koncentraciju produkata aktivacije HPA ose u periodu nakon povrede kako bi se moglo govoriti o postojanju sistemskih promena nakon povrede perifernog nerva koje bi mogle biti odgovorne za uočenu promenu funkcija PMF. Takođe, u narednim istraživanjima bi se mogao ispitati i modulatorni efekat kondicioniranog medijuma u kome bi se kultivisali operisani nervi na funkcije periotonealnih makrofaga iz netretiranih intaktnih životinja.

U nastavku ovog istraživanja pokazano je da tretman vitaminima B kompleksa

pored benefita u smislu bržeg oporavka povređenog nerva ispoljava i pozitivan efekat na funkcionalne karakteristike PMF tako što uspeva da poništi zabeležen imunosupresivni efekat povrede na PMF. Ovaj pozitivan efekat terapije vitaminima B kompleksa na imunski sistem je veoma važan jer je poznato da supresija imunskog sistema nakon povreda dovodi do komplikacija opšteg stanja pacijenta. Ovi rezultati otvaraju mnogo novih mogućnosti za istraživanja mehanizama delovanja terapije vitaminima B kompleksa na PMF ne samo nakon povrede perifernog nerva nego i u nekim drugim patološkim stanjima, kao i u normalnim fiziološkim uslovima.

Nakon *ex vivo* istraživanja urađeno je *in vitro* ispitivanje funkcionalnih karakteristika obogaćene populacije PMF kako sponatnih tako i ispitivanje njihove sposobnosti da odgovore na dodatni stimulus (lipopolisaharid i forbal miristat acetat). Uočeno je da PMF izolovani iz tretiranih i vitaminima B kompleksa tretiranih životinja u *in vitro* uslovima ispoljavaju slične funkcionalne sposobnosti uključujući sponatnu i stimulisanu sposobnost adhezije, fagocitoze, kao i produkcije reaktivnih oblika kiseonika, NO, TNF- $\alpha$  i IL-10 kao i PMF izolovani iz lažno operisanih životinja, dok PMF operisanih a netretiranih životinja i u *in vitro* uslovima ispoljavaju smanjenje svih ispitivanih funkcija. Ovi rezultati nisu u skladu sa literaturnim rezultatim koji govore o direktnom *in vitro* efektu različitih vitamina B na PMF uključujući suprimirajući efekat riboflavina na produkciju NO-a i TNF- $\alpha$  od strane PMF izolovanih iz miševa (Quershi i sar, 2013) i niacina na sintezu proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 od strane PMF (Lipszyc i sar., 2013). Ove razlike se mogu pripisati različitim načinima primene vitamina B u istraživanjima prikazanim u literaturi i načinu primene, doze i kombinacije vitamina B primenjenom u ovom istraživanju. Pozitivan efekat vitamina B kompleksa u ovom istraživanju se može objasniti pozitivnim delovanjem ove terapije na proces regeneracije povređenog perifernog nerva i smanjenjem sistemskog odgovora organizma na prisutnu traumu a ne direktnim delovanjem na PMF. U budućim istraživanjima je potrebno u serumu/plazmi životinja svih ispitvanih grupa odrediti nivo sistemskih pokazatelja neurohumoralanog stresa za koje se pretpostavlja da su odgovorni za imunosupresivno delovanje na PMF u samo operisanim životinjama. Važno je istaći da je primenjena terapija na ovom modelu povrede perifernog nerva uspela da normalizuje funkciju PMF što može biti veoma iskorišćeno u kliničkoj praksi u cilju smanjenja komplikacija kod traumatizovanih pacijenata indukovanih

imunosupresivnim efektom traume. Stoga rezultati ovog istraživanja predstavljaju osnovu za istraživanja dubljih mehanizama delovanja vitamina B kompleksa na ovom modelu povrede, kao i za nova istraživanja primene ovih lekova na animalnim modelima različitih trauma uključujući i opekotine kao jednu od veoma teških trauma. Takođe, u narednim istraživanjima je potrebno ispitati i direktan efekat korišćene kombinacije vitamina B kompleksa na funkcionalne karakteristike PMF u *in vitro* uslovima.



## **6. ZAKLJUČCI**

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, a na osnovu iznetih rezultata mogu se formulisati sledeći zaključci:

❖ Na modelu transekcije i rekonstrukcije termino-terminalnom anastomozom motorne grane femoralnog nerva pacova pokazano je da povreda perifernog nerva

1. utiče na električnu aktivnost, atrofiju i funkciju ciljnog mišića kvadricepsa.
2. da u ispitivanom periodu praćenja dolazi do oporavka funkcije motorne grane femoralnog nerva procenjivano testom ponašanja, procentom atrofije mišića inervisanog rekonstruisanim nervom i EMG mišića kvadricepsa.
3. atrofija mišića postaje detektabilna sedmog dana nakon povrede perifernog nerva, povećava se tokom daljeg perioda posmatranja ali se posle 30. dana smanjuje.
4. tokom perioda posmatranja dolazi do oporavka električne aktivnosti mišića.
5. povreda perifernog nerva utiče na povećanje gustine ćelijskih jedara u području povrede femoralnog nerva i povećanje gustine ćelijskih jedara u njime inervisanom mišiću.
6. aktivira proliferaciju i dediferencijaciju Švanovih ćelija
7. dovodi do degradacije mijelinskog omotača
8. smanjenje ekspresije GAP-43 do 14. dana nakon čega dolazi do povećanja izrastanja aksona
9. dovodi do proliferacije i diferencijacije satelitskih ćelija u mioblaste
10. utiče na smanjenje funkcionalnih karakteristika peritonealnih makrofaga uključujući smanjenu sposobnost fagocitoze i adhezije *ex vivo* i *in vitro*, kao i smanjenu produkciju ROS, NO, TNF i IL-10 *in vitro*.

❖ Terapija vitaminima B kompleksa dovodi do

1. boljeg oporavka motorne funkcije povređenog nerva procenjivano testom ponašanja, stepenom atrofije mišića i EMG-om.
2. smanjenja gustine ćelijskih jedara u području povrede femoralnog nerva i mišića kvadricepsa.
3. smanjene dediferencijacije Švanovih ćelija u povređenom nervu i ubrzanom povratku u diferenciranu srpastu formu.

4. smanjenja degradacije mijelina u povređenom nervu.
5. bržeg izrastanja aksona procenjavano ekspresijom GAP-43.
6. smanjene proliferacije i diferencijacije satelitskih ćelija što je pokazatelj poboljšane reinervacije.
7. normalizuje ispitivane funkcije peritonealnih makrofaga i povećava sposobnost odgovore na dodatni M1 stimulus.

## **7. LITERATURA**

Adeyemi-Doro HO. Pattern of peripheral traumatic neuropathy of the upper limb in Lagos. *Injury* 1988;19:329-32.

Adler R. Ciliary neurotrophic factor as an injury factor. *Current Opinion in Neurobiology* 1993;3:785-789.

Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, i Margioris AN. Corticotropin releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages *in vitro* i in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 2007; 70: 6068–6074.

Agnello D, Bertini R, Sacco S, Meazza C, Villa P, Ghezzi P. Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin. *Am J Physiol* 1998. 275: E757–E762.

Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T. Protective effects of a vitamin B12 analog, ethylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 1993; 241(1):1-6.

Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol* 2012; 98(1):16-37.

Altavilla D, Cainazzo MM, Squadrito F, Guarini S, Bertolini A, Bazzani C. Tumour necrosis factor- $\alpha$  as a target of melanocortins in haemorrhagic shock, in the anaesthetized rat. *British Journal of Pharmacology* 1998; 124:1587-1590.

Altavilla D; Bazzani C, Squadrito F, Cainazzo MM, Mioni C, Bertolini A, Guarini S. Adrenocorticotropin inhibits nitric oxide synthase II mRNA expression in rat macrophages. *Life sciences* 2000; 66(23): 2247-225.

Andjelkovic S, Lesic AR, Palibrk T, Vuckovic C, Sudjic V, Bumbasirevic MZ. Digital nerve injury of the hand-epidemiologic and clinical analysis. *Acta Chir Iugosl* 2010; 57:95-8.

Angelov D, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Grosheva M, Kiryakova S, Skouras E, Maegele M, Irintchev A, Neiss W, Sinis N, Alvanou A, Dunlop S. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol. Dis* 2007; 26:229–242.

Apel PJ, Ma J, Callahan M, Northam CN, Alton TB, Sonntag WE, Li Z. Effect of locally delivered IGF-1 on nerve regeneration during aging: an experimental study in

rats. *Muscle and Nerve* 2010; 41:335-341.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Coumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; 317:666–670.

Ayoub IA, Maynard KI. Therapeutic window for nicotinamide following transient focal cerebral ischemia. *Neuroreport* 2002; 13(2):213-6.

Babar SM. Peripheral nerve injuries in a Third World country. *Cent Afr J Med* 1993; 39:120-5.

Badke A, Irintchev AP, Wernig A. Maturation of transmission in reinnervated mouse soleus muscle. *Muscle Nerve* 1989 Jul; 12(7): 580-6.

Bamberger CM and Bamberger AM. The peripheral CRH/urocortin system. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 290–296.

Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2004; 88 (6):1335–44.

Barker A. An introduction to the basic principles of magnetic nerve stimulation. *J Clin Neurophysiol* 1991; 8:26–37.

Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 34–46.

Bennett DL, Averill S, Clary DO, Priestley JV, McMahon SB. Postnatal changes in the expression of the trkA high-affinity NGF receptor in primary sensory neurons. *European Journal of Neuroscience* 1996; 8:2204-2208.

Betz AL, Ren XD, Ennis SR, Hultquist DE. Riboflavin reduces edema in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994; 60:314-7.

Biedron R, Ciszek M, Tokarczyk M, Bobek M, Kurnyta M, Slominska EM, Smolenski RT, Marcinkiewicz J. 1-Methylnicotinamide and nicotinamide: two related anti-inflammatory agents that differentially affect the functions of activated macrophages. *Arch Immunol Ther Exp* 2008; 56:127-134.

Birch R, Raji A. Repair of median and ulnar nerves – primary suture is best. *J Bone Joint Surg* 1991; 73(1):154–157.

Birch R. Nerve repair. In: Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC, Wolfe SW, editors. *Green's Operative Hand Surgery*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Churchill

Livingstone; 2005. p. 1075-1113.

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Interrelations of Myogenic Response, Progressive Atrophy of Muscle Fibers, and Cell Death in Denervated Skeletal Muscle. *Anato Rec* 2001; 264 (2):203–18.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):458-62.

Bou Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *PNAS* 2010; 107:2568–73.

Bouquet C, Nothias F. Molecular mechanisms of axonal growth. *Adv Exp Med Biol* 2007; 621:1-16.

Boyd JG, Gordon T. The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *Journal of Neurobiology* 2001; 49:314-325.

Brandt KE, Mackinnon, SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. In: Aston, SJ, Beasley, RW, Thorne CHM, editors. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 79-91.

Bruck W, Friede RL. Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol* 1990; 80:415-418.

Bubber P, Ke ZJ, Gibson GE. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int* 2004; 45(7):1021-8.

Bubko I, Gruber BM, Anuszevska EL. The role of thiamine in neurodegenerative diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2015; 69: 1096-106.

Buck KB, Zheng JQ. Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J Neurosci* 2002 ;22:9358 –9367.

Bumbaširević M, Lešić A, Bumbaširević V, Čobeljić G, Milošević I, Atkinson HD. The management of humeral shaft fractures with associated radial nerve palsy: a review of 117 cases. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010; 130(4):519-22.

Bumbaširević, M.; Stevanović, M.; Sudjić, V.; Vučković, Č.; Vukov, V: Factors influencing the primary nerve reconstruction in finger and MC replantation. 6<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Societies for Surgery of the Hand, Helsinki,

1995.

Bunge MB, Williams AK, Wood PM. Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Developmental Biology* 1982; 92:449-460.

Byrnes KR, Wu X, Waynant RW et al. Low-power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. *Lasers Surg Med* 2005; 37:161–71.

Cafferty WB, Gardiner NJ, Gavazzi I, Powell J, McMahon SB, Heath JK, Munson J, Cohen J, Thompson SW. Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons. *Journal of Neuroscience* 2001; 21:7161-7170.

Cain DW, O’Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, Hopper K. Identification of a tissue-specific, C/EBPbeta-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 2013; 191(9):4665–75.

Camara-Lemarroy CR, Gonzales-Moreno EI, Guzman-de la Garza FJ, Fernandez-Garza NE. Arachidonic acid derivatives and their role in peripheral nerve degeneration and regeneration. *The Scientific World Journal*. 2012: 2012:168953. Epub 2012 Sep 10.

Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology* 2008; 119:1951-1956.

Cassado Ados A, de Albuquerque JA, Sardinha LR, Buzzo Cde L, Faustino L, Nascimento R, Ghosn EE, Lima MR, Alvarez JM, Bortoluci KR. Cellular Renewal and Improvement of Local Cell Effector Activity in Peritoneal Cavity in Response to Infectious Stimuli. *PLoS ONE* 2011; 6(7): e22141.

Challacombe, J.F., Snow, D.M., Letourneau, P.C. Dynamic microtubule ends are required for growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *J. Neurosci.* 1997; 17:3085–3095.

Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):738-49.

Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:826–37.

Chen J, Lee JH, Jakocevski I, Shah, Bhagat N, Loers G, Liu HY, Meiners S, Taschenberg G, Kuegler S, Irintchev A, Schachner M. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C is beneficial for spinal cord regeneration. *Mol. Ther* 2010; 18: 1769-1777.



- Chouchkov C. Cutaneous receptors. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1978; 54:3.
- Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface* 2012; 9:202-21.
- Davies LC, et al. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2011; 41:2155–2164.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE and Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013; 14: 986–995.
- Dermitzaki E, Tsatsanis A, Gravanis C and Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2002; 277:12280–12287.
- Dimitrijevic M, Pilipovic I, Stanojevic S, Mitic K, Radojevic K, Pesic V, Leposavic G. Chronic propranolol treatment affects expression of adrenoceptors on peritoneal macrophages and their ability to produce hydrogen peroxide and nitric oxide. *J Neuroimmunol*, 2009; 211: 56–65.
- Dimitrijevic M, Stanojevic S, Vujic V, Aleksic I, Pilipovic I, Leposavic G. Aging oppositely affects TNF- $\alpha$  and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology* 2014; 15:475-486.
- Dioszeghy V, Rosas M, Maskrey BH, Colmont C, Topley N, Chaitidis P, Kuhn H, Jones SA, Taylor PR, O'Donnell VB. 12/15-Lipoxygenase regulates the inflammatory response to bacterial products in vivo. *J Immunol* 2008; 181(9): 6514–24.
- Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450(3):191-231.
- Eaton M. Common animal models for spasticity and pain. *J Rehabil Res Dev* 2003; 40: 41-54.
- Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 359–368.
- Engler KL, Rudd ML, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. Autocrine actions of macrophage derived catecholamines on interleukin-1 $\beta$ . *J Neuroimmunol*

2005; 160: 87–91.

Ernfors P, Rosario CM, Merlio JP, Grant G, Aldskogius H, Persson H. Expression of mRNAs for neurotrophin receptors in the dorsal root ganglion and spinal cord during development and following peripheral or central axotomy. *Brain Research Molecular Brain Research* 1993; 17:217-226.

Erturk A, Hellal F, Enes J, Bradke F. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J Neurosci* 2007; 27:9169-9180.

Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan C. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol India* 2009; 57:434-7.

Evans B, Litchy W, Daube J. The utility of magnetic stimulation for routine peripheral nerve conduction studies. *Muscle Nerve* 1988; 11:1074–8.

Feingold KR, Moser A, Shigenaga JK and Grunfeld C. Inflammation stimulates niacin receptor (GPR109A/HCA2) expression in adipose tissue and macrophages. *J. Lipid Res* 2014; 55: 2501–2508.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997; 14:67–116.

Fujii A, Matsunomo H, Yamamoto H. Effect of vitamin B complex on neurotransmission and neurite outgrowth. *Gen Pharmac* 1996; 27(6):995-1000.

Fujitani M, Kawai H, Proija RL, Kashiwagi A, Yasuda H, Yamashita T. Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction. *Journal of Neurochemistry* 2005; 94:15-21.

Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 2011; 8(1): 110-122.

Geremia NM, Gordon T, Brushart TM et al. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol* 2007; 205:347–359.

Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 2010 Feb 9;107(6):2568-73.

Gillen C, Korfhage C, Muller HW. Gene expression in nerve regeneration. *Neuroscientist* 1997; 112-122.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330: 841–845.

Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, Spatafora M, Profita M, Vignola AM, Bonsignore G and Toews GB. Phenotypic and Functional Characterization of Normal Rat Pleural Macrophages in Comparison with Autologous Peritoneal and Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 135–142.

Glazner GW, Lupein S, Miller JA, Ishii DN. Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neuroscience* 1993; 54:791-797.

Gordon S and Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953–964.

Gordon T, Sulaiman OAR, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2003; 236-250.

Gordon-Weeks PR, Mansfield SG. Assembly of microtubules in growth cones. The role of microtubule-associated proteins. Raven Press 1992; 55-64.

Grujičić D, Rakočević-Stojanović V, Lavrnić D (1998). Klinička dijagnostika povreda perifernih nerava. In: Samardžić M, Antunović V, Grujičić D, editors. *Povrede i oboljenja perifernih nerava*. 1st ed. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998. p. 70-123.

Gu J, He XR, Han YL. Effect of Draconis Sanguis-containing serum on NGF, BDNF, CNTF, LNGFR, TrkA, GDNF, GAP-43 and NF-H expressions in Schwann cells. *Zhanguo Zhang Yao Za Zhi* 2015; 40(7):1392-5.

Gudas L. Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821:213–221.

Guirland C, Suzuki S, Koima M, Lu B, Zheng JQ. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 2004; 42:51-62.

Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss W, Angelov D. Factors limiting motor recovery after facial nerve

transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci* 2005; 21:391–402.

Hall JA, Grainger JR, Spencer SP and Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 2011; 35: 13–22.

Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in peripheral nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1986: 27-46.

Harding AJ, Christmas CR, Ferguson MW, Loescher AR, Robinson PP, Boissonade FM. Mannose-6-phosphate facilitates early peripheral nerve regeneration in thy-1-YFP-H mice. *Neuroscience*. 2014; 279:23-32.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley BM, Leboeuf M, Beckern CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes *Immunity* 2013; 38:792-804.

Hashimoto D, et al. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity*. 2013; 38:792–804.

Higashino K, Matsuura T, Suganuma K, Yukata K, Nishisho T, Yasui N. Early changes in muscle atrophy and muscle fiber type conversion after spinal cord transection and peripheral nerve transection in rats. *J Neuroeng Rehabil* 2013; 10(1):46.

Hiromatsu Y, Sato M, Yamada K, Nonaka K. Inhibitory effects of nicotinamide on recombinant human interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM-1) and HLA-DR antigen expression on cultured human endothelial cells. *Immunol Lett* 1992; 31:35–39.

Hoane MR, Akstulewicz SL, Toppen J. Treatment with vitamin B3 improves functional recovery and reduces GFAP expression following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2003; 20(11):1189-99.

Hoane MR, Wolyniak JG, Akstulewicz SL. Administration of riboflavin improves behavioral outcome and reduces edema formation and glial fibrillary acidic protein expression after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005; 22(10):1112-22.

Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P. C-myb(+) erythromyeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident

macrophages. *Immunity* 2015; 42(4):665–78.

Hoffman PN, Cleveland DW. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of aspecific beta-tubulin isotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85:4530-4533.

Hoffman PN, Lasek RJ. Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. *Brain Research* 1980; 202:317-333.

Hoke A, Mi R. In search of novel treatments for peripheral neuropathies and nerve regeneration. *Discov Med* 2007; 7:109-112.

Hoke A, Redett R, Hameed H, Jari R, Zhou C, Li ZB, Griffin JW, Brushart TM. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *Journal of Neuroscience* 2006; 26:9646-9655.

Hoke A. Mechanisms of disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2:448-454.

Hu Y, Leaver SG, Plant GW, Hendriks WT, Niclou SP, Verhaagen J. Lentiviral mediated transfer of CNTF to Schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cells survival and axonal regeneration. *Molecular Therapy* 2005; 11:906-915.

Hwang IK, Yoo KY, Kim do H, Lee BH, Kwon YG, Won MH. Time course of changes in pyridoxal 5'-phosphate (vitamin B6 active form) and its neuroprotection in experimental ischemic damage. *Exp Neurol* 2007; 206(1):114-25.

Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S and Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32: 470–477.

Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, Birren SJ, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson DJ. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 1992; 69:1121-1132.

Irintchev A, Simova O, Eberhardt K, Morellini F, Schacher M. Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single-frame motion analysis in mice. *Eur J Neurosci* 2005; 22 (4):802-8.

Irintchev A. Potentials and limitations of peripheral nerve injury models in

rodents with particular reference to the femoral nerve. *Ann Anat* 2011; 193 (4):276-85.

Ishii K, Sarai K, Sanemori H, Kawasaki T. Concentrations of thiamine and its phosphate esters in rat tissues determined by high-performance liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1979; 25(6):517-23.

Itokawa Y. Thiamine and nervous system function: an historical sketch. *Metab Brain Dis* 1996; 11(1):1-7.

Izeboud CA, Mocking JA, Monshouwer M, van Miert AS and Witkamp RF. Participation of  $\beta$ -adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *J Recept Signal Transduct Res* 1999; 19:191–202.

Jander S, Bussini S, Neuen-Jacob E, Bosse F, Menge T, Muller HW, Stoll G. Osteopontin: a novel axon-regulated Schwann cell gene. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 67:156-166.

Jeffrey F and Underhill LH. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332(20): 1351–1362.

Jesuraj NJ, Nguyen PK, Wood MD, Moore AM, Borschel GH, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Differential gene expression in motor and sensory Schwann cells in the rat femoral model. *J Neurosci Res* 2012; 90:96-104.

Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y. Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 24: 245-254.

Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A. Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(5):848-54.

Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg Mikael. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem cells and development*. 2014; 23(7):741-54.

Klaidman LK, Mukherjee SK, Hutchin TP, Adams JD. Nicotinamide as a precursor for NAD<sup>+</sup> prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Neurosci Lett* 1996; 206(1):5-8.

Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve* 2006; 34:785-8.

Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 1997;

20:815-822.

Kury P, Zickler P, Stoll G, Hartung HP, Jander S. Osteopontin a macrophage-derived matricellular glycoprotein, inhibits axon outgrowth. *FASED Journal* 2005; 19:398-400.

Kuypers NJ, Hoane MR. Pyridoxine administration improves behavioral and anatomical outcome after unilateral contusion injury in the rat. *J Neurotrauma* 2010; 27(7):1275-82.

La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Exp Med* 1996; 184:2311-2326.

Lavin Y and Merad M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res* 2013; 1: 201–209.

Lawrence WT, Kashyap A. Healing of Nerves, Blood Vessels, Muscle, Tendon, Cartilage and Bone. In: Achauer BM, Eriksson E, editors. *Plastic Surgery Indications, Operations and outcomes*. 1<sup>st</sup> ed. St. Louis: Mosby, Inc; 2000. p. 79-97.

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2000; 8(4):243-52.

Lewis AK, Bridgman PC. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *Journal of Cell Biology* 1992; 119:1219-1243.

Liao WC, Chen JR, Wang YJ, Tseng GF. Methylcobalamin, but not methylprednisol or pleiotrophin, accelerates the recovery of rat biceps after ulnar to musculocutaneous nerve transfer. *Neuroscience* 2010; 171 (3):934-49.

Liao WC, Wang YJ, Huang MC, Tseng, GF. Methylcobalamin facilitates collateral sprouting of donor axons and innervation of recipient muscle in end-to-side neuroorrhaphy in rats. *PLoS ONE* 2013; 8(9): e76302.

Linehan E, Dombrowski Y, Snoddy R, Fallon PG, Kissenpfennig A and Fitzgerald DC. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell* 2014; 13: 699–708.

Lipszyc PS, Cremaschi AS, Zubilete MZ, Bertolino MLA, Capani F, Genaro AM, Wald MR. Niacin modulates pro-inflammatory cytokine secretion. A potential

mechanism involved in its anti-atherosclerotic effect. *The open cardiovascular medicine journal* 2013; 7:90-98.

Lopez NE, Krzyzaniak M, Costantini TW, De Maio A, Baird A, Eliceiri BP, Coimbra R. Vagal Nerve Stimulation Blocks Peritoneal Macrophage Inflammatory Responsiveness after Severe Burn Injury,” *Shock*, 2012. 38(3):294–300.

Lu MC, Tsai CC, Chen SC, Tsai FJ, Yao CH, Chen YS. Use of electrical stimulation at different current levels to promote recovery after peripheral nerve injury in rats. *J Trauma*. 2009; 67(5):1066-72.

Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107(6):1419-29.

Mackinnon, SE; Dellon, AL *Surgery of the peripheral nerve*. New York. Thieme Medical Publishers 1988.

Madison RD, Sofroniew MV, Robinson RV. Schwann cell influence on motor neuron regeneration accuracy. *Neuroscience* 2009; 163(1):213–221.

Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27(2):134-42.

Maruya M, Suzuki K, Fujimoto H, Miyajima M, Kanagawa O, Wakayama T and Fagarasan S. Vitamin A-dependent transcriptional activation of the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) is critical for the development and survival of B1 cells. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 722–727.

McComas AJ. Oro-facial muscles: internal structure, function and ageing. *Gerodontology* 1998; 15:3-14.

McQuarrie IG, Brady ST, Lasek RJ. Retardation in the slow axonal transport of cytoskeletal elements during maturation and aging. *Neurobiology of Aging* 1989; 10:359-365.

Miledi R, Slater CR. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J Physiol* 1970; 207:507-528.

Monboisse J, Garnotel R, Randoux A, Dufer J, Borel J. Adhesion of human neutrophils to and activation by type-I collagen involving a beta 2 integrin. *J Leukoc Bio* 1991; 50(4):373–380.

Mu X, Silos-Santiago I, Carroll SL, Snider WD. Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *Journal of*



Neuroscience 1993; 13:4029-4041.

Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol* 2001; 159:2187-2197.

Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA, editors. *Harpers Illustrated Biochemistry*. 29<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill; 2012.

Nance DM and Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain Behav Immun* 2007; 21:736–745.

Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res* 2005; 163:143-158.

Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998; 45:116-22.

O'Brien, BMcC, Morrison, WA, editors. *Reconstructive Microsurgery*. New York: Churchill Livingstone; 1987.

O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 1992; 22:711–717.

Oez S, Welte K, Platzer E, Kalden and JR. A simple assay for quantifying the inducible adherence of neutrophils. *Immunobiology* 1990; 180(4–5):308–315.

Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014; 157(4):832–44.

Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. *Exp Neurol* 2010; 222(2):191-203.

Palos MC, Azevedo MCA, Thies FZ, Osugui L, Alvares AM, Laurindo MF, Russo RT, Popi AF, Mariano M. Different inflammatory stimuli in the footpad of mice influence the kinetics of resident peritoneal cells. *Inflamm Res* 2012; 61:1187-1194.

Pekovich SR, Martin PR, Singleton CK. Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not alpha-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types. *J Nutr* 1998; 128(4):683-7.

Perry TA, Weerasuriya A, Mouton PR, Holloway HW, Greig NH. Pyridoxine-induced toxicity in rats: a stereological quantification of the sensory neuropathy. *Exp Neurol* 2004; 190(1):133-44.

Pfister LA, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. *J Peripher Nerv Syst* 2007; 12:65-82.

Politis MJ, Spencer PS. A method to separate spatially the temporal sequence of axon-Schwann cell interaction during nerve regeneration. *Journal of Neurocytology* 1981; 221-232.

Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology* 2004; 113: 348–354.

Pu SF, Zhuang HX, Marsh DJ, Ishii DN. Insulin-like growth factor II increases and IGH is required for postnatal rat spinal motoneuron survival following sciatic nerve axotomy. *Journal of Neuroscience Research* 1999; 55:9-16.

Qian BZ, Li J Zhang, Kitamura, T H, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA and Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475:222–225.

Quan D, Bird SJ. Nerve Conduction Studies and Electromyography in the Evaluation of Peripheral Nerve Injuries. *Univ Pennsylvania Orthop J* 1999; 12:45–51.

Qureshi AA, Tan X, Reis JC, Badr ZB, Papiasian CJ, Morrison DC and Qureshi N. Suppression of nitric oxide induction and proinflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models. *Lipids in health and disease* 2011; 10:177.

Radojic T, Baird S, Darko D, Smith D and Bulloch K. Changes in beta-adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: an analysis of T cells and macrophages. *J Neurosci Res* 1991; 30: 328–33.

Rafuse VF, Gordon T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscles. I. Comparison of the capacity of regenerating nerves to form enlarged motor units after extensive peripheral nerve injuries. *J. Neurophysiol* 1996; 75 (1):268-81.

Raivich G, Kreutzberg GW. Pathophysiology of glial growth factor receptors. *Glia* 1994; 11:129-146.

Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Carragher DM, Kusser K, Hartson L,

Moquin A and Randall TD. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 2009; 30: 731–743.

Reyes-Garcia G, Caram-Salas NL, Medina-Santillan R, Granados-Soto V. Oral administration of B vitamins increases the antiallodynic effect of gabapentin in the rat. *Proc West Pharmacol Soc* 2004; 47:76–9.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve* 2000; 23:863-73.

Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87:445–64.

Roganović Z. Missile-caused median nerve injury: result of 81 repairs. *Surgical neurology* 2005; 63(5):410-418.

Roganović Z. Missile-caused ulnar nerve injuries. Outcomes of 128 repairs. *Neuro-surgery* 2004; 55 (5):1120-1129.

Roganović ZB. Povrede perifernih nerava. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1997.

Rosbery HE, Carlsson KS, Hoejgard S, Londgren B, Lundborg G, Dahlin LB. Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm-analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. *The Journal of Hand Surgery. Journal of the British Society for Surgery of the Hand* 2005; 30(1):35-39.

Sasaki H, Matsuzaki Y, Meguro K, Ikarashi Y, Maruyama Y, Yamaguchi S, Sekizawa K. Vitamin B12 improves cognitive disturbance in rodents fed a choline-deficient diet. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43 (2):635–9.

Schenker M, Burstedt MK, Wiberg M, Johansson RS. Precision grip function after hand replantation and digital nerve injury. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006; 59:706-16.

Scherer SS, Wang DY, Kuhn R, Lemke G, Wrabetz L, Kamholz J. Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP. *Journal of Neuroscience* 1994; 14:1930-1942.

Seddon HJ. War injuries of peripheral nerves in wounds of the extremities. *Br J Surg (War Surgery Suppl)* 1948; 2:325, cited in Terzis JK, Smith KL. Repair and

Grafting of the Peripheral Nerve. In: McCarthy JG, Saunders WB, editors. Plastic Surgery. 3rd edition: W.B. Saunders company; 1990. p. 630-698.

Selecki BR, Ring IT, Simpson DA, Vanderfield GK, Sewell MF. Trauma to the central and peripheral nervous systems. Part II: A statistical profile of surgical treatment New South Wales 1977. Aust N Z J Surg 1982; 52:111-6.

Selvarajan K, Moldovan L, Chandrakala AN, Litvinov D, Parthasarathy S. Peritoneal macrophages are distinct from monocytes and adherent macrophages. Atherosclerosis 2011; 219: 475–483.

Shea J, Garlick J, Salama M, Mendenhall S, Moran L, Agarwal J. Side-to-side nerve bridges reduce muscle atrophy after peripheral nerve injury in a rodent model. J Surg Res 2014; 187(1):350-8.

Shen ZL, Lassner F, Bader A, Becker M, Walter GF, Berger A. Cellular activity of resident macrophages during Wallerian degeneration. Microsurgery 2000; 20:255-261.

Sherrington CS. Ferrier Lecture-some functional problems attaching to convergence. Proc R Soc Lond (Biol), 105:332, 1929 cited in Terzis JK, Smith KL. Repair and Grafting of the Peripheral Nerve. In: McCarthy JG, Saunders WB, editors. Plastic Surgery. 3rd edition: W.B. Saunders company; 1990. p. 630-698.

Siegel SG, Patton B, English AW. Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. Experimental Neurology 2000; 166:205-212.

Sigola LB1, Zinyama RB. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. Immunology. 2000 Jul;100(3):359-63.

Sodhi CP, Li J, Duncan SA. Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of Gata6. BMC Dev Biol 2006; 6:19.

Steinman RM, Moberg CL. Zanzvil Alexander Cohn 1926-1993. J Exp Med 1994; 179:1–30.

Sulaiman OAR, Boyd JG, Gordon T. Axonal regeneration in the peripheral system of mammals. Oxford University Press 2005; 454-466.

Sunderland S, editor. Nerves and Nerve Injuries. Edinburgh: E. & S. Livingstone; 1968, cited in Terzis JK, Smith KL. Repair and Grafting of the Peripheral Nerve. In: McCarthy JG, Saunders WB, editors. Plastic Surgery. 3rd edition: W.B.

Saunders company; 1990. p. 630-698.

Takahashi, K. Development and Differentiation of Macrophages and Related Cells: Historical Review and Current Concepts. *J Clin Exp Hematop* 2001; 41: 1–33.

Takahashi, K., Yamamura, F., and Naito, M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 1989; 45: 87–96.

Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson JR. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact and binding properties. *Journal of Neuroscience* 1988; 664-681.

Terzis JK, Smith KL. Repair and Grafting of the Peripheral Nerve. In: McCarthy JG, Saunders WB, editors. *Plastic Surgery*. 3<sup>rd</sup> edition: W.B. Saunders company; 1990. p. 630-698.

Tham S, Dowsing B, Finkelstein D, Donato R, Cheema SS, Bartlett PF, Morrison WA. Leukemia inhibitory factor enhances the regeneration of transected rat sciatic nerve and the function of reinnervated muscle. *Journal of Neuroscience Research* 1997; 47:208-215.

Thies FG, Laurindo MFL, Perez EC, Novaes e Brito RR, Mariano M et al. Cross Talk between Peritoneal Macrophages and B-1 Cells In Vitro. *PLoS ONE* 2013; 8(5): e62805

Thorin-Trescases N, Thorin E. Angiotensin-like 2: a multifaced protein with physiological and pathophysiological properties. *Expert Re Mol. Med*, 2014; 16: e17.

Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 2002; 22:6696-6703.

Tria MA, Fusco M, Vantini G, Mariot R. Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol* 1994; 127:178–183.

Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Spiess J, Gravanis A and Margioris AN. Urocortin 1 and urocortin 2 induce macrophage

apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett* 2005; 579:4259–4264.

Tsatsanis C, Androulidaki A, Themis A, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP. *J Immunol* 2006; 176:1869-1877.

Turan MI, Cayir A, Cetin N, Suleyman H, Siltelioglu Turan I, Tan H. An investigation of the effect of thiamine pyrophosphate on cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in rat brain tissue compared with thiamine: thiamine and thiamine pyrophosphate effects on cisplatin neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2014; 33(1):14-21.

Turnbull AV, Vale W and Rivier C. Urocortin, a corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, inhibits edema due to thermal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 1996; 303: 213–216.

Umikawa M, Umikawa A, Asato T, Takei K, Matsuzaki M, Kariya K, Zhang CC. Angiotensin-like protein 2 induces proinflammatory responses in peritoneal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 467(2):235-41.

Vasilescu C, Florescu A. Peripheral neuropathy with a syndrome of continuous motor unit activity. *J Neurol* 1982; 226 (4):275–82.

Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyery RL, Holt CE, Fawcett JW. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci.* 2005; 25(2):331-42.

Villarejo FJ, Pascual AM. Injection injury of the sciatic nerve (370 cases). *Childs Nerv Syst* 1993; 9:229-32.

Vogelin E, Baker JM, Gates J, Dixit V, Constantinescu MA, Jons NF. Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology* 2006; 199:348-353.

Waeber G, Thompson N, Chautard T, Steinmann M, Nicod P, Pralong FP, Calandra T and Gaillard RC. Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3, 5-monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells. *Mo Endocrinol*, 1998; 12: 698–705.

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schoenfeld D, Seltzer Z,

Tomkiewitz MM. Autonomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979; 7: 103-111.

Wang JT, Medress ZA, Barres BA. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol* 2012; 196:7-18.

Watanabe T, Kaji R, Oka N, Bara W, Kimura J. Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *J Neurol Sci* 1994; 122 (2):140–3.

Weber GA, Sloan P, Davies D. Nutritionally induced peripheral neuropathies. *Clin Podiatr Med Sur.* 1990; 7(1):107-28.

Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, and Chrousos GP. Corticotropin- releasing hormone and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 21–32.

Weiss DD, Pribaz JJ. Microsurgery. In: Achauer BM, Eriksson E, editors. *Plastic Surgery*. St. Louis: Health Science Company; 2000. p. 163- 183.

Witehead J, Keller-Patrick C, Kucera J, Tourtellotte WG. Glial cell-line derived neurotrophic factor-dependant fusiform neuron survival during development. *Mech Dev* 2005; 122: 27-41.

Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat* 2011; 193 (4):321-33.

Xin J, Wainwright DA, Mesnard NA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ: IL-10 within the CNS is necessary for CD4(+) T cells to mediate neuroprotection. *Brain Behav Immun* 2011; 25:820-829.

Yamatsu K, Kaneko T, Kitahara A, Ohkawa I. Pharmacological studies on degeneration and regeneration of peripheral nerves. (1) Effects of methylcobalamin and cobamide on EMG patterns and loss of muscle weight in rats with crushed sciatic nerve. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1976; 72 (2):259–68.

Yamazaki K, Oda K, Endo C, Kikuchi T, Wakabayashi T. Methylcobalamin (methyl-B12) promotes regeneration of motor nerve terminals degenerating in anterior gracile muscle of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse. *Neurosci Lett* 1994; 170 (1):195–7.

Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, Mitchison T, Luo L, He Z. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of Wallerian degeneration. *Neuron* 2003; 39:217-225.

Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, Lodish HF. Angiopoietin like proteins stimulate *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells. Nat Med 2006; 12:240-245.



## **8. PRILOZI**

Rezultati prikazani u disertaciji su objavljeni u sledećim bibliografskim jedinicama:

1. **Nedeljkovic P**, Zmijanjac D, Draskovic-Pavlovic B, Vasiljevska M, Vucevic D, Bozic B, Bumbasirevic M. Vitamin B complex treatment improves motor nerve regeneration and recovery of muscle function in a rodent model of peripheral nerve injury. Archives of Biological Sciences. 69:(1) 2017 *in press*
2. **Nedeljkovic P**, Zmijanjac D, Pavlovic-Draskovic B, Vucevic D, Vasiljevska M, Markovic M, Vasilijic S, Bumbasirevic M, Bozic B. Vitamin B therapy improves peripheral nerve regeneration and modulates peritoneal macrophage activity on rat femoral nerve injury model. VII Scientific meeting of Serbian Immunology society, Belgrade, Serbia, 2016. Abstract book p7
3. Bozic B, **Nedeljkovic P**, Zmijanjac D, Pavlovic-Draskovic B, Vasiljevska M, Vucevic D. Functional aspects of peritoneal macrophages after femoral nerve injury. 4th European Congress of Immunology, September 6-9, 2015. Vienna, Austria. Abstract Book. P.C.22.07. p341

## 8.1. BIOGRAFIJA KANDIDATA

Predrag Nedeljković je rođen 06. 09. 1973. godine u Zagrebu. Osnovnu školu je završio u Osijeku, a srednju u Beogradu 1992. godine. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1992. i završio 1999. godine sa prosečnom ocenom 8.94. Septembra 1999. godine odlazi na odsluženje vojnog roka. Državni ispit polaže 2000. godine. Specijalizaciju iz plastične i rekonstruktivne hirurgije započinje 2000. godine na Vojnomedicinskoj akademiji. Specijalistički ispit polaže 2005. godine sa ocenom 5. Godine 2003. upisuje magistarske studije iz oblasti hirurške anatomije. Magistarsku tezu pod naslovom „Hirurško-anatomske karakteristike *n. suralis-a* kao potencijalnog nervnog kalema“, pod mentorstvom prof. dr Marka Bumbaširevića, odbranio je 2007. godine. Iste godine uspešno je pohađao međunarodni seminar iz mikrohirurgije krvnih sudova i nerava u organizaciji Victor Babes Univerziteta iz Temišvara. Tokom 2012. i 2014. godine stručno se usavršava iz oblasti hirurgije distalnog radijusa, karpusa i šake (Jesenice, Celje, Kranjska Gora, Beč). Kao autor ili koautor učesnik je nacionalnih, balkanskih, evropskih i svetskih kongresa iz oblasti plastične i rekonstruktivne hirurgije i hirurgije šake. Od 2005. godine zaposlen je u Institutu za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“ kao specijalista plastične i rekonstruktivne hirurgije, baveći se pretežno rekonstruktivnom hirurgijom ekstremiteta, posebno šake, kao i hirurgijom perifernih nerava.

## 8.2. IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani-a mr Predrag Nedeljković

broj upisa \_\_\_\_\_

Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom

Efekat hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na regeneraciju motorne funkcije perifernog nerva na modelu povrede femoralnog nerva pacova

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 30.6.2016.

Potpis doktoranda



### **8.3. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE**

Ime i prezime autora **mr Predrag Nedeljković**

Broj upisa /

Studijski program /

Naslov rada Efekat hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na regeneraciju motorne funkcije perifernog nerva na modelu povrede femoralnog nerva pacova

Mentor prof. dr Marko Bumbaširević

Potpisani mr Predrag Nedeljković

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.6.2016.



## 8.4. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **Efekat hipervitaminske terapije vitaminima B kompleksa na regeneraciju motorne funkcije perifernog nerva na modelu povrede femoralnog nerva pacova** koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.6.2016.

