

Iztok Gril¹, Marko Jug²

Pomen Schwannovih celic za vzdrževanje regeneracije senzoričnih aksonov pri podgani³

The Role of Schwann Cells in Maintaining Regeneration of Sensory Axons in the Rat³

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: Schwannove celice, živec regeneracija, periferni živec – poškodbe, rastne snovi

Dobro regeneracijo aksonov po poškodbi perifernega živca omogočajo razmnožene Schwannove celice (SC) v distalnem krnu, ki izločajo topne spodbujevalne dejavnike, in bazalne lamine SC. Le-te tvorijo nevrilemske cevke, ki predstavljajo ugodno rastno podlago za aksone. Rezultati raziskav o relativnem pomenu topnih dejavnikov in rastne podlage so delno protislovni. Novejša študija je pokazala, da se senzorični aksoni med regeneracijo skozi brezcelični distalni krn po relativno hitri rasti v prvem tednu po poškodbi ustavijo. Vodeči aksoni se nato retrahirajo proti mestu poškodbe. Do nove rasti pride samo, če je možna migracija SC iz proksimalnega krna. Dosedanji rezultati kažejo, da bi za zaustavitev rasti aksonov lahko bila odgovorna degeneracija rastne podlage v odsotnosti SC. Preverili bomo hipotezo, da je za zaustavitev rasti aksonov po prvem tednu regeneracije krivo mikrookolje aksonov, ne pa morebitna izčrpanost perikariona, hipotezo, da je z ohranjanjem primerne rastne podlage mogoče vzdrževati rast v drugem tednu tudi brez podpore SC, ter hipotezo, da je z zagotavljanjem topnih rastnih dejavnikov v drugem tednu kljub odsotnosti SC in delno degenerirani rastni podlagi moč preprečiti retrakcijo aksonov. V raziskavi smo suralni živec podgane poškodovali z aksonotmezo. V prvi skupini živali smo celice v distalnem odseku živca z enkratnim zmrzovanjem uničili vse do konca odseka, kontinuiteta cevke BL pa ni bila prekinjena. V drugi skupini živali smo zmrzovali le 10 oz. 15 mm dolg odsek živca za mestom aksonotmeze in pustili celice distalno ohranjene. V tretji skupini živali smo distalni odsek dvakrat zapored zmrzovali v razmaku štirih dni. Drugo zmrzovanje je zajelo odsek distalno od prvega. V četrti skupini smo v celoti zmrzovani distalni odsek *n. suralis* ovili v degeneriran odsek *n. peroneus*. Hitrost regeneracije najhitrejših aksonov smo testirali s testom uščipa živca. Aksoni smo na prečnem prerezu živca prikazali z imunohistokemično reakcijo na nevrofilament. Potrdili smo, da se začetna hitra rast senzoričnih aksonov skozi popolnoma brezcelični odsek distalno od aksonotmeze po osmih dneh ustavi. Ustavitvi rasti sledi retrakcija vodečih aksonov. Pri regeneraciji skozi 10 oz. 15 mm dolg brezcelični odsek do ustavitve rasti ne pride. Rast aksonov skozi dvakrat zapored zmrzovani odsek živca se v drugem tednu ne ustavi, je pa počasnejša. Elongacija aksonov skozi brezcelični odsek, obložen z degeneriranim živčnim odsekom, se v drugem tednu ne ustavi, se pa upočasni. Ustavitve rasti aksonov skozi brezcelični distalni odsek živca je torej posledica neugodnih razmer v mikrookolju regenerirajočih se aksonov. Z ohranjanjem dobre rastne podlage lahko vzdržujemo rast dalj časa kljub stalni odsotnosti celične podpore. Z dodajanjem topnih dejavnikov SC lahko vzdržujemo rast med podaljšano regeneracijo skozi brezcelični distalni odsek živca tudi ob delno degenerirani rastni podlagi.

¹ Iztok Gril, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Marko Jug, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

³ Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1999.

ABSTRACT

KEY WORDS: Schwann cells, nerve regeneration, peripheral nerve – injuries, trophic factors

Satisfactory regeneration of axons after crush injury of peripheral nerve is supported by proliferating Schwann cells (SC) in the distal stump and their basal laminae (BL). SC secrete diffusible growth-promoting substances, whereas basal laminae provide a good growth substratum within the neurilemmal tubes. The results of previous studies of the relative importance of diffusible growth-promoting substances and growth substratum are partly contradictory. A recent study showed that sensory axons regenerating through the acellular distal nerve segment elongated fairly rapidly during the first week after axonotmesis, but then ceased to grow. The leading axons retracted towards the site of axonotmesis. Subsequent elongation was possible only with concurrent migration of SC from the proximal stump. Previous experiments indicated that degeneration of growth substratum in the absence of Schwann cells could be responsible for the cessation of axonal growth. The objective of the study was to examine the following hypotheses: that cessation of axonal growth and retraction of sensory axons during the second week of regeneration in the absence of cell support is a consequence of an unfavourable microenvironment of the regenerating axons and is not due to permanent »exhaustion« of the neuron cell body; that, if an adequate growth substratum is maintained, axons continue to grow during the second week even in the absence of SC; and that elongation of axons can be maintained during prolonged regeneration through the acellular distal nerve segment by providing diffusible growth promoting substances of SC, even though the growth substratum is partly degenerated. In this study, a rat sural nerve was crushed. In the first group of animals, cells in the distal stump were killed by freezing the entire distal segment at once. In the second experimental group, only 10 or 15 mm long segment of the nerve adjacent to the crush site was frozen in order to leave the cells distally alive. Nerves in the third group of animals were frozen twice, with an interval of four days in between. The second freezing was applied to the nerve segment, distally to the first. In the fourth group, a nerve sandwich was composed of a frozen sural nerve wrapped in a degenerated segment of the peroneal nerve. The elongation rate of regenerating axons was monitored by nerve pinch test. Axons in the nerve cross-sections were demonstrated by immunohistochemical staining of neurofilaments. We confirmed that rapid initial growth of sensory axons through a completely acellular distal nerve segment stopped after eight days. Thereafter, the leading axons began to retract. When the regeneration of axons through 10 or 15 mm long acellular segments was examined, there was no reduction in the elongation rate. The growth of axons along successively frozen nerve segments did not stop during the second week, although it did slow down. The elongation of axons through the nerve sandwich was slowed down during the second week, but it did not stop. Cessation of axon growth through an acellular distal nerve segment in a crushed nerve is a consequence of an unfavourable microenvironment of the regenerating axons. By maintaining good growth substratum, growth can be sustained, even though viable cells are not present. By providing diffusible growth promoting factors (secreted by SC), we enabled the axons to elongate during prolonged regeneration even in the presence of partly degenerated growth substratum.

UVOD

Periferni živec je zaradi svoje izpostavljenosti vzdolž okončin in lege med tršimi in odpornejšimi strukturami, kot so kosti, kite in mišice, pogosto podvržen poškodbam. Le-te so najpogosteje posledica akutnega ali kroničnega pritiska, nategnitve, laceracije, pa tudi ishemije ter drugih fizikalnih, kemičnih in patoloških procesov. Okvara živca je skoraj vedno povezana z izgubo funkcije v inervacijskem področju prizadetega živca. Poleg mehaznizma poškodbe pa je za njeno napoved odločilnega pomena stopnja okvare perifernega živca (1, 2).

Ob močnem pritisku na živec pride do prekinutve aksonov. Tako poškodbo imenujemo aksonotmeza. Živec makroskopsko ni prekinjen, nevrilemske cevke iz bazalnih lamin Schwannovih celic tudi ne, aksoni pa distalno od mesta poškodbe propadejo. Ohranjenost nevrilemskih cevk omogoča aksonom regeneracijo vzdolž svojih prejšnjih potekov in reinervacijo svoje nekdanje tarče. Napoved je v teh primerih zelo ugodna. Povsem drugače je pri nevrotnmezi, ko ob popolni prekinutvi živca pride tudi do prekinutve nevrilemskih cevk. Tu morajo aksoni tudi po najnatančnejši mikrokirurški oskrbi prerasti vrzel med obema krnoma. Pri tem vstopajo v nevrilemske cevke distalnega krna naključno. Posledica je napačno usmerjanje aksonov, funkcijsko okrevanje pa zato nikoli ni popolno, ne kvantitativno (ne regenerirajo vsi aksoni) ne kvalitativno (zaradi napačne usmeritve), pa tudi čas do reinervacije je močno podaljšan.

Prav nevrotnmeza predstavlja še dandanes, kljub izpopolnjeni kirurški tehniki, precejšen terapevtski izziv rekonstruktivni kirurgiji. Glavni problem zdravljenja nevrotnmeze je poleg težavne koaptacije živčnih fasciklov, ki s sabo nosi problem usmerjanja aksonov proti napačnim tarčam, tudi počasna rast aksonov, predvsem pa se pojavljajo hude težave, kadar je potrebna premostitev več kot 30 mm dolge vrzeli (angl. *gap*) med proksimalnim in distalnim krnom živca (1). V tem primeru namreč še vedno najpogosteje uporabljajo presadek *n. suralis*a, kar vodi v neizogibno žrtvovanje občutljivosti na predelu kože, ki jo oživčuje. Druga slaba stran takih presad-

kov je seveda tudi njihova omejena razpoložljivost. Da bi se izognili tem slabostim, se kot nadomestilo išče možnost uporabe umetnih in kadaverskih presadkov, ki pa do zdaj še niso dali zadovoljivih rezultatov. Pomembnejših izboljšav mikrokirurških tehnik danes ni več pričakovati, zato poskušajo napredek v zdravljenju zagotoviti predvsem raziskave fizioloških in patofizioloških dogajanj v perifernem živcu med razvojem, ob poškodbi živca in ob regeneraciji. Poleg kliničnih izkušenj so nepogrešljive raziskave na poskusnih živalih in celičnih kulturah. Zato se raziskovalci najbolj posvečajo ugotavljanju prisotnosti morebitnih snovi, ki bi regenerirajoče se aksone usmerjale (nevtrotropne snovi), in preučevanju snovi, ki spodbujajo njihovo rast (angl. *nerve growth promoting substances*). V obeh primerih gre za snovi, ki nastajajo v mikrookolju, skozi katerega regenerirajoči se aksoni rastejo.

REGENERACIJA PERIFERNEGA ŽIVCA

Regeneracija perifernega živca je nasprotno od regeneracije v osrednjem živčevju (OŽ) obsežna. Pokazali so, da lahko presadki perifernega živca zagotavljajo ugodno okolje in vzbudijo regeneracijo aksonov celo v OŽ, medtem ko je regeneracija aksonov perifernega živca v presadek iz OŽ zelo slaba (3, 4). Ugotovitve navedenih raziskav podpirajo domnevo, da je prav mikrookolje, skozi katerega rastejo aksonski brsti, ključnega pomena za uspešno regeneracijo. Najpomembnejša spodbudna dejavnika mikrookolja v poškodovanem perifernem živcu pa se zdita ugodna rastna podlaga in povečana tvorba topnih rastnih dejavnikov, ki jih izločajo celice v distalnem krnu (1, 5).

Dejavniki mikrookolja

Spremembe v distalnem krnu po poškodbi perifernega živca

Poškodbi perifernega živca sledi v distalnem krnu proces, imenovan Wallerjeva degeneracija. Aksoni propadejo, njihove mielinske ovojnice in aksoplazemski citoskelet se razgradijo (6). Drugi do tretji dan po poškodbi sledi namnožitve celic v distalnem krnu, ki

doseže vrhunec v štirinajstem dnevu (7). Makrofagi vdoro iz ožilja (8, 9), število celic se štirikrat poveča; kar dve tretjini teh pa predstavljajo razmnožujoče se Schwannove celice (SC) (6, 10). Obe vrsti celic s fagocitozo očistita distalni krn ostankov aksonov in mielina. Namnožene SC se v starih ohranjenih cevkah bazalnih lamin staknejo in razvrstijo v t. i. Büngnerjeve stolpiče (1).

Ob sposobnosti fagocitoze imajo SC tudi pomembno sekrecijsko vlogo. Enako velja za makrofage. Ti vplivajo na razmnoževanje SC (7) ter izločajo interleukin 1 (IL-1), ki spodbuja SC k izločanju živčnega rastnega dejavnika (angl. *nerve growth factor*, NGF) (11, 12). Poleg tega izločajo še druge beljakovine, med njimi 37 kD težki apolipoprotein E, ki verjetno sodeluje pri recikliranju lipidov v poškodovanem živcu (1, 13), in trombocitni rastni dejavnik (angl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) (14).

Topni dejavniki v distalnem krnu

Topni rastni dejavniki so snovi, ki na nevron delujejo spodbujevalno med razvojem, diferenciacijo in/ali regeneracijo. Znanih je že precej takih molekul, med njimi pa so najbolj raziskani NGF, možganski nevrotrofni dejavnik (angl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), insulinu podobni rastni dejavniki (angl. *insulin-like growth factors*, IGF-1 in IGF-2), trombocitni rastni dejavnik (angl. *platelet-derived growth factor*, PDGF), fibroblastni rastni dejavnik (angl. *fibroblast growth factor*, FGF), ciliarni nevrotrofični dejavnik (iz angl. *ciliary neurotrophic factor*, CNTF), nevrotrofin 4/5 in levkemijo inhibirajoči dejavnik (angl. *leukemia inhibitory factor*, LIF) (5). Njihove potencialne učinke po poškodbi lahko v grobem razdelimo v tri skupine: izboljšanje preživetja nevronov, spodbujanje regeneracije in indukcija kolateralnega brstenja (15).

Te molekule lahko delujejo na različne načine. Po klasični teoriji nevrotrofizma jih kot topne dejavnike izločajo tarčne celice in delujejo na nevrone prek receptorjev na membrani njihovih aksonskih končičev, ter nato z retrogradnim transportom pridejo v telo celice. Značilen dejavnik te vrste je NGF. Rita Levi-Montalcini je pokazala, da ima NGF močan spodbujevalni učinek na rast senzoričnih in

simpatičnih nevronov v piščančjem zarodku (16–18). Receptorje za NGF izražajo med razvojem živčevja na membranih senzoričnih, simpatičnih in tudi motoričnih nevroni, trofični učinek pa je izražen le pri senzoričnih in simpatičnih, na motorične nevrone NGF takega vpliva nima (19–21). Normalno NGF sintetizirajo in sproščajo tarčna tkiva senzoričnih in simpatičnih aksonov (22–24). Specifični receptorji na membranih teh aksonov vežejo sproščeni NGF, kompleks NGF-receptor vstopi v akson in se prenese z retrogradnim transportom proti telesu nevrona (25), kjer modificira izražanje nekaterih genov in posttranslacijske dogodke (26, 27). Za NGF obstajata na membranih odraslih senzoričnih in simpatičnih nevronov dve vrsti receptorjev: receptor z veliko afiniteto (trkA) in receptor z majhno afiniteto (gp75), ki ni specifičen za NGF, temveč z enako afiniteto veže tudi BDNF in nevrotrofin-3 (28).

Pomen NGF pri regeneraciji senzoričnih aksonov po poškodbi perifernih živcev pa kljub številnim raziskavam ni jasen, saj so si rezultati raziskav pogosto nasprotujoči in jih ni mogoče sestaviti v razvidno sliko. Po poškodbi aksona se dotok NGF iz tarčnih tkiv prekine. V distalnem krnu, kjer poteka Wallerjeva degeneracija, se močno poveča tvorba NGF, ker dva do tri dni po poškodbi makrofagi z izločanjem IL-1 začnejo spodbujati fibroblaste in SC k izločanju NGF (11, 12). Izražanje obeh vrst receptorjev za NGF na aksolemi poškodovanih nevronov pa se, presenetljivo, močno zmanjša (29). Zato se kljub povečani tvorbi NGF v distalnem krnu med regeneracijo aksonov zmanjša retrogradni prenos kompleksa NGF-receptor v telo poškodovanega nevrona (27). Poskusi z dodajanjem eksogenega NGF so pokazali, da tako dodani NGF zmanjša izgubo nevronov po poškodbi (30, 31). Poskusi, v katerih so preprečili učinek endogenega NGF med regeneracijo s protitelesi proti NGF, pa niso pokazali učinka na preživetje nevronov po aksonotmezi in hitrost regeneracije (32). Ne moremo torej izključiti možnosti, da je bil ugodni učinek eksogeno dodanega NGF farmakološki in ne fiziološki, saj so bile koncentracije, dosežene pri dodajanju, mnogo višje.

Na nevronske membrane so tudi receptorji za BDNF, ki pomaga pri preživetju in dozore-

vanju senzoričnih nevronov in poškodovanih motonevronov med razvojem (33).

IGF-1 in IGF-2 sta majhna polipeptida, ki delujeta zelo nespecifično, saj je njun receptor prisoten v skoraj vseh tkivih (34). Pomembna sta med razvojem organizma, v poskusih pa so dokazali, da po poškodbi perifernega živca pospešujeta rast aksonov (35) in proliferacijo SC, če te migrirajo v brezcelični distalni krn (36). Aplikacija protiteles proti IGF-1 in/ali IGF-2 močno upočasni regeneracijo aksonov (35).

LIF je beljakovina, katere izražanje se v distalnem krnu po poškodbi živca poveča, poveča pa se tudi njen retrogradni prenos v telo nevrona. Izboljša preživetje motoričnih in senzoričnih nevronov po poškodbi (37).

Rastna podlaga za aksone v distalnem krnu

Po poškodbi perifernega živca si regenerirajoči se aksoni vedno vtirajo pot v distalni krn med SC in notranjo površino cevki njihovih bazalnih lamin (BL) (38, 39). Iz tega sklepa, da rastno podlago regenerirajočim se aksonom v poškodovanem živcu predstavljata prav notranja površina cevki BL in plazmalemata SC (40). Če so s toplotno obdelavo poleg odstranitve SC denaturirali še beljakovine v BL, se je selektivnost brstov za notranjo površino BL izgubila, hitrost regeneracije pa se je zmanjšala na 10% normalne vrednosti (38, 41–43).

Ena izmed pomembnejših sestavin BL je glikoprotein laminin. Receptorji zanj (integrini družine b_1) (44) so izraženi na aksolemi. Raziškave so pokazale, da je prav laminin odločilnega pomena zato, da aksoni za rast vedno izberejo notranjo površino BL, saj so dokazali, da v distalnem krnu protitelesa proti lamininu tudi ob intaktni BL povzročijo izgubo selektivnosti aksonov za notranjo površino cevki (42, 43). Poskusi *in vitro* s celičnimi kulturami so poleg afinitete rastočih aksonov za laminin, fibronektin in še nekatere druge površinske molekule BL in SC (44–46) pokazali, da ima laminin haptotaktični učinek predvsem kot sestavina BL, vezan na kolagen tipa IV. Ugotovili so namreč, da je *in vitro* afiniteta aksonov za laminin, če je ta vezan na druge podlage, npr. polilizin, manjša (47).

Relativen pomen Schwannovih celic oz. njihove bazalne lamine za rast regenerirajočih se aksonov

Vprašanje relativnega pomena SC oz. njihove BL za rast regenerirajočih se aksonov ostaja še vedno odprto, saj so za preučevanje tega problema v preteklosti uporabljali različne metode in tako tudi dobivali nasprotnojoče si rezultate.

Ko so kot model v poskusu za poškodbo živca uporabili nevrotmezo z uporabo zmrzovanih živčnih presadkov, ki so vsebovali BL, ne pa tudi SC, so pokazali, da je bilo vraščanje aksonov v takšen presadek onemogočeno, če so v proksimalnem krnu proliferacijo SC zavrlili (48). Tudi pri neprizadetih SC v proksimalnem krnu je bila dolžina rasti regenerirajočih se aksonov v dolg brezcelični krn omejena na manj kot 20 mm (49). Ta dognanja so vodila v prepričanje, da sama BL ni dovolj za vrast aksonov v distalni krn in da predstavlja le neke vrste podlago za migracijo SC, kateri naj bi sledili regenerirajoči se aksoni (48, 49). Tako so izpostavili pomen živih SC za uspešno elongacijo aksonov v brezcelični živčni presadek.

Po drugi strani pa so ugotovili, da je po aksonotmezi, ki poškoduje aksone, nevrolemseke cevke pa ostanejo pri tem neprekinjene, rast aksonov v brezcelični distalni krn neovirana (38, 41, 50). Tudi v teh poskusih so uporabljali metodo zmrzovanja in odtajanja distalnega segmenta. Pokazalo se je, da aksoni rastejo skozi notranjost cevki BL, hitrost rasti pa se je zmanjšala le za okrog 30%. Tudi ob aplikaciji mitomicina, ki zavre razmnoževanje SC, do bistvenega zmanjšanja hitrosti ni prišlo, kar kaže na manjši pomen SC pri regeneraciji aksonov po aksonotmezi. Elongacijo aksonov so v teh poskusih zasledovali le prvi teden po poškodbi.

Protislovnost teh dognanj se je delno pojasnila v poskusih, kjer so regeneracijo po aksonotmezi zasledovali dalj časa. Ugotovili so, da elongacija aksonov v zmrznjen in odtajan distalni krn v prvem tednu po aksonotmezi res ni ovirana, vendar se v drugem tednu po poškodbi ustavi. Ustavitvi rasti sledi retrakcija aksonov, ki se nadaljuje še tretji in četrti teden po poškodbi vse do mesta, ki so ga v tem času dosegle iz proksimalnega krna migrirajoče SC. Nadaljnja počasna rast

aksonov sledi počasni migraciji SC, v primeru zavrte proliferacije SC v proksimalnem krnu pa aksonov v distalnem krnu sploh ni več zaznati (51). Aksoni torej za nadaljevanje rasti potrebujejo SC.

Na podlagi teh ugotovitev sklepajo, da je za umik aksonov po desetem dnevu kriva degeneracija rastne podlage in/ali izčrpanje učinkov topnih rastih dejavnikov v odsotnosti SC. To bi pojasnilo razliko med rezultati v poskusih, v katerih so kot poskusno poškodbo uporabili aksonotmezo, in tistimi, v katerih je bila uporabljena nevrotmeza. Pri popolni prekinitvi živca aksoni namreč vraščajo v brezcelični distalni krn približno 14 dni kasneje kot pri aksonotmezi (52), verjetno zaradi dolgotrajne rasti čez vrzel med krnoma. Podlaga, na katero naletijo po tem času, pa je že preveč spremenjena, da bi jim omogočila uspešno elongacijo. V takih razmerah, ki so podobne razmeram v drugem tednu po aksonotmezi, aksoni rastejo zelo počasi, in to le ob spremstvu SC (49, 52, 53). Pokazala se je različna sposobnost rasti aksonov v odvisnosti od časa, v katerem so regenerirajoči se aksoni izpostavljeni brezceličnemu okolju distalnega krna. Skladno s tem so ugotovili, da regenerirajoči se aksoni lahko prerastejo 2–3 cm dolg brezcelični odsek živca in, čeprav z zamudo, popolnoma obnovijo bolečinsko občutljivost kože, če distalno od zmrznjenega odseka obstaja živec z živimi SC, ki lahko migrirajo do aksonov in jim omogočijo rast (54).

NAMEN IN HIPOTEZA NALOGE

Vse kaže, da so za neuspešnost regeneracije v drugem tednu po poškodbi aksonov, ki rastejo v brezcelični distalni segment, odgovorne predvsem degenerativne spremembe v mikrokolju, bodisi zaradi sprememb rastne podlage in/ali učinkov pomanjkanja topnih spodbujevalnih dejavnikov. Morda pa je ustavitev rasti in retrakcija aksonov posledica »izčrpanosti« telesa nevrona v takih razmerah.

Te domneve v dosedanji literaturi še niso dobile končnega odgovora, zato je smo v želji, da bi jih bodisi potrdili ali ovrgli, postavili naslednje delovne hipoteze:

1. Retrakcija senzoričnih aksonov v drugem tednu po poškodbi in regeneraciji v odsotnosti

celične podpore ni posledica trajnih sprememb v telesu nevrona, ampak odsev neustreznih razmer v mikrokolju regenerirajočih se aksonov. Ob ugodnih razmerah v distalnem segmentu elongacija aksonov v drugem tednu ni prizadeta.

2. Z ohranitvijo primerne rastne podlage lahko vzdržujemo rast aksonov v drugem tednu po poškodbi, oz. preprečimo njihovo retrakcijo, tudi ob trajni odsotnosti SC.
3. Z dodajanjem topnih dejavnikov SC lahko vzdržujemo rast aksonov, oz. preprečimo njihovo retrakcijo, tudi med podaljšano regeneracijo skozi brezcelični odsek živca, kljub delno degenerirani rasti podlagi.

MATERIALI IN METODE

Operativni postopki

Živali in anestezija

Poskusi so potekali v laboratorijih Inštituta za patološko fiziologijo MF Univerze v Ljubljani, ki ima dovoljenje Ministrstva za kmetijstvo za delo s poskusnimi živalmi (št. odločbe 326-07-26/98).

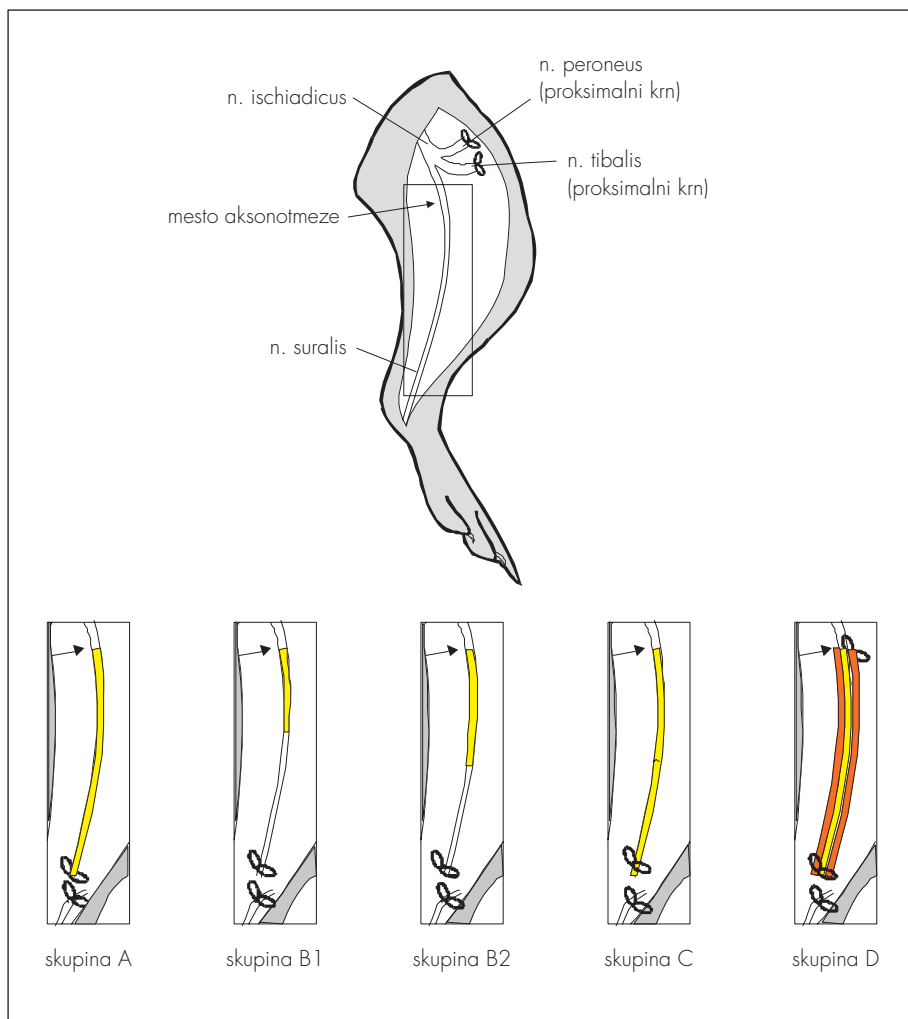
Vse poskuse smo izvajali na samcih belih laboratorijskih podgan soja Wistar. Živali so ob prvi operaciji tehtale od 250 do 350 gramov. Kot anestetik smo pri operacijah uporabili mešanico dihidrotiazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Nemčija, 5 mg/kg) in ketamin-hidroklorida (Ketanest, Parke-Davis GMBH, Berlin, Nemčija, 90 mg/kg), ki smo jo vbrizgali intraperitonealno. Pri testu uščipa živca je bila potrebna plitvejša anestezija, ki smo jo dosegli s pentobarbitalom (Vetanarcol, Veterinaria AG, Zürich, Švica, 20 mg/kg i. p.).

Kirurški posegi

Poskusne živali smo razvrstili v štiri skupine (slika 1).

Skupina A – REGENERACIJA SKOZI BREZCELICNI ODSEK ŽIVCA

Živalim smo v globoki anesteziji s standardnim pristopom skozi kožo, mišice in fascije stegna in goleni izpostavili področje podkolenske jame (*fossa poplitea*). Približno 1 cm distalno od odcepišča *n. suralis*a od *n. ischiadicusa* smo drugi dve končni veji *n. ischiadicusa* (*n. tibialis* in *n. peroneus*) podvezali in pre-



Slika 1. Shematski prikaz poskusnih razmer v posameznih skupinah. Mesto aksonotmeze je prikazano s puščico. Zmrznjeni odsek *n. suralis* je prikazan z rumenim zasenčenjem. Degenerirani odsek *n. peroneusa*, ki obdaja *n. suralis*, je prikazan v rdeči barvi.

zali. Prerezali smo tudi medialno in lateralno kožno vejo, *n. cutaneus surae medialis* in *lateralis*. *N. suralis* smo nato ločili od veziva in spremljajočih žil čim bolj distalno v njegovem poteku. Distalno smo ga podvezali in prerezali, potem pa približno 3 mm od odcepa *n. ischiadicusa* napravili aksonotmezo. Živec smo 15 s stiskali z 1 mm širokim šivalnikom z gladkima prijemalnima ploskvama, nato pa proksimalni rob poškodbe označili s tankim šivom (10/0) skozi epinevrij. Odsek živca distalno od označbe smo podložili s ploščico

iz pleksi stekla za zaščito okolnega tkiva in ga s suhim ledom (CO_2 , $T = -70^\circ\text{C}$) zmrzovali, ga potem odtajali s fiziološko raztopino sobne temperature in postopek ponovili še dvakrat, tako da je zmrzovanje in odtajanje trajalo približno 3 minute. *N. suralis* smo reponirali v njegov normalni potek, podvezani konec pa s šivom pritrdili na mišico *triceps surae*. Rano v mišicah na stegnu smo zašili, kožo speli s sponkami in pustili žival okrevati. Operirali smo v čistih, ne pa sterilnih razmerah. V skupini je bilo 31 živali.

Skupina B – REGENERACIJA SKOZI 10 OZ. 15 mm DOLG BREZCELIČNI ODSEK ŽIVCA
Postopek pri tej skupini je bil podoben kot pri skupini A. Izpostavili smo *n. suralis*, ga 3 mm distalno od odcepa od *n. ischiadicusa* stiskali s šivalnikom, le da smo nato distalno od poškodbe s suhim ledom zmrzovali odsek, dolg 10 mm (podskupina B1) oz. 15 mm (podskupina B2), ne pa celotni odsek izoliranega živca. Bolj distalni odsek živca (približno 15 mm) je tako še vseboval žive SC. Distalno smo živec podvezali in prerezali. V podskupini B1 je bilo 19, v podskupini B2 pa 16 živali.

Skupina C – REGENERACIJA SKOZI ZAPOREDNO ZMRZOVANI ODSEK ŽIVCA

Pri tej skupini sta bili potrebni dve operaciji. Prva je bila enaka kot pri skupini B, le da smo zmrzovali 18 mm dolg odsek distalno od poškodbe. Distalno od tega odseka so ostale SC ohranjene. Žival smo pustili okrevati štiri dni. Četrti dan smo žival zopet operirali in zmrznili odsek od 18 mm distalno od aksonotmeze do konca živca in živec zopet pritrtili na mišico. V skupini je bilo 16 živali.

Skupina D – REGENERACIJA SKOZI BREZCELIČNI ODSEK ŽIVCA OB PODPORI TOPNIH DEJAVNIKOV IZ OBLOGE DEGENERIRANE ŽIVCA

Ta skupina je potrebovala operacijo v dveh korakih. Prvi je bil enak kot pri skupini A, le da smo odsek *n. suralis*a distalno od aksonotmeze ovili v 20 mm dolg izrezan odsek *n. peroneusa* tako, da smo odsek *n. peroneusa* z epinevrijskim šivom (10/0) fiksirali z začetkom na mestu poškodbe. Pri tem smo pazili, da smo z epinevrijem *n. peroneusa* popolnoma objeli *n. suralis* in vso vsebino *n. peroneusa* samega. Epinevrij *n. peroneusa* smo zato na štirih mestih vzdolž 20 mm dolgega odseka speli z epinevrijskim šivom (10/0). V skupini je bilo 12 živali.

TESTIRANJA IN MERITVE

Test uščipa

Razdaljo, ki so jo najhitrejši regenerirajoči senzorični aksoni dosegli v določenem času, smo ugotavljali s testom uščipa živca (angl. *pinch test*) (41, 52). V plitvi barbituratni anesteziji smo *n. suralis* izpostavili in ločili od vezi-

va, nato pa smo ga s tanko pinceto rahlo sčipali. Začeli smo na distalnem koncu in z milimetrskimi koraki nadaljevali v proksimalni smeri proti označenemu mestu aksonotmeze. Mesto na živcu, kjer smo ob uščipu prvič zaznali odgovor (refleksna skrčitev mišic na stegnu in v dimljah), smo označili s šivom. Žival smo žrtvovali. Potem smo prerezali *n. ischiadicus* visoko v stegnu, ga položili na ravnilo in izmerili razdaljo na *n. suralisu* med mestom aksonotmeze in mestom pozitivnega uščipnega testa.

Imunohistokemični prikaz nevrofilamente vsebujočih aksonov v distalnem krnu

Po testu uščipa smo izolirani odsek živca fiksirali v pufranem formalinu (pH 7,4) 24 ur, ga dehidrirali v alkoholni vrsti naraščajočih koncentracij in ga vklopili v parafin. Nato smo odsek živca prečno prerezali z britvico 15 mm distalno od mesta poškodbe, označenega s šivom, in vzeli prečne rezine debeline 2–5 mm. Za imunohistokemično označevanje nevrofilamentov v rezinah smo uporabili aparat za avtomatično imunohistokemično analizo TECHMATE 500 na Onkološkem inštitutu. Uporabili smo metodo LSAB (streptavidin-biotinska metoda označevanja). Antigene smo demarkirali z mikrovalovno predobdelavo (dvakrat po 5 minut) v citratnem pufru. Nato smo pri sobni temperaturi nanесли primarno protitelo NFMoAB (klon 2F11) – DAKO (Glostrup, Danska). Vsi uporabljeni reagenti so predpisani za uporabo aparata za avtomatično imunohistokemično barvanje TECHMATE 500 in so proizvod firme DAKO, Danska.

STATISTIČNE METODE

Za analizo razlik med dvema vzorcema smo uporabljali Studentov t-test z Bonferronijevim popravkom. Skupine podatkov v poskusni skupini A smo analizirali s statističnim testom za analizo variance. Hitrost regeneracije v skupini A smo določili s formulo za izračun naklona regresijske premice (48).

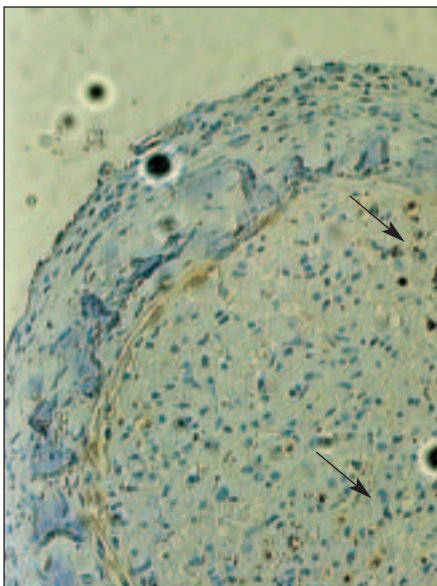
Pri delu smo uporabljali računalniška programa SPSS in Microsoftov Excel 97.

REZULTATI

Elongacija senzoričnih aksonov po poškodbi

Regeneracija skozi brezcelični odsek živca

Kot smo ugotovili s testom uščipa živca (slika 3), so v poskusni skupini A aksoni rastle skozi brezcelični odsek *n. suralis* distalno od poškodbe do 8. dneva po aksonotmezi s stalno hitrostjo ter prišli približno 18 mm distalno od mesta poškodbe. Hitrost rasti, izmerjena kot naklon regresijske premice v obdobju 4–8 dni po poškodbi, je bila 2,4 mm/dan. Temu je v drugem tednu sledila zaustavitev elongacije, 14. dan po aksonotmezi pa smo zasledili najhitreje aksone v oddaljenosti le okrog 13 mm od mesta poškodbe, kar kaže, da se je točka, na kateri so aksoni že prisotni, pomaknila nazaj proti mestu aksonotmeze. Razlika v razdaljah med 8. in 14. dnem je statistično značilna ($p < 0,001$). Dosežene razdalje od 8. do 14. dneva smo analizirali s statističnim testom za analizo variance. Po dve skupini smo nato med seboj primerjali s Studentovim



Slika 2. *N. suralis* po osmih dneh regeneracije aksonov skozi brezcelični distalni krn. Prečni rez skozi distalni krn. Prikaz imunohistokemične reakcije na nevofilament v aksonih. S puščicami so prikazani aksoni, vidni kot rjave pege.

t-testom, pri čemer smo upoštevali Bonferronijev popravek.

Za ilustracijo smo prikazali regenerirajoče se aksone osem dni po poškodbi, 15 mm distalno od mesta aksonotmeze (slika 2).

Regeneracija skozi 10 oz. 15 mm dolg brezcelični odsek živca

V poskusni skupini B, kjer so aksoni regenerirali skozi 10 oz. 15 mm dolg brezcelični odsek *n. suralis*, ki se je nato nadaljeval v neokrnjeni distalni krn, smo s testom uščipa živca merili največjo razdaljo, ki so jo dosegli regenerirajoči se aksoni 8, 10, 12 in 14 dni po poškodbi (slika 3).

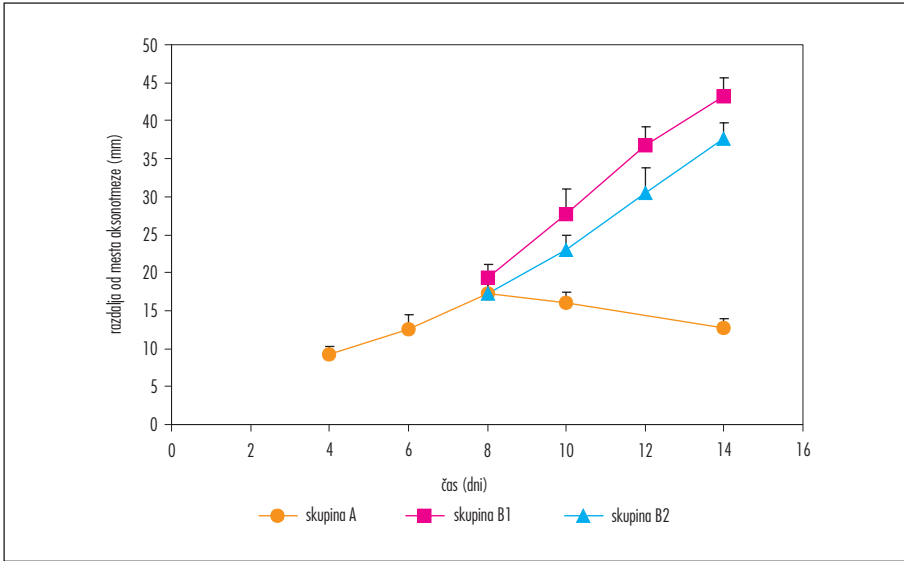
V primerjavi s skupino A razdalja, dosežena po 8 dneh, ni bila statistično različna niti pri 10 mm ($p > 0,1$) niti pri 15 mm ($p > 0,5$) dolgem zmrzovanem odseku. 14. dan je bila dosežena razdalja statistično značilno večja kot v skupini A tako pri 10 mm ($p < 0,001$) kot pri 15 mm ($p < 0,001$) dolgem zmrzovanem odseku. Po dve skupini smo med seboj primerjali s Studentovim t-testom, pri čemer smo upoštevali Bonferronijev popravek. V opazovanem obdobju v skupinah B1 in B2 ni prišlo do nobenega zastoja rasti regenerirajočih se aksonov.

Regeneracija skozi zaporedno zmrzovani odsek živca

Pri poskusni skupini C, kjer je bil distalni odsek živca dvakrat zapored zmrzovan, se razdalja, ki so jo aksoni dosegli 8. dan, ni statistično značilno razlikovala od razdalje, dosežene pri skupini A ($p > 0,5$). Razdalja, dosežena 14. dan, pa je statistično značilno večja kot pri skupini A ($p < 0,001$). Prav tako je bila statistično značilna ($p < 0,05$) razlika med razdaljama, doseženima 8. in 14. dne v sami skupini C (slika 4). Po dve skupini smo med seboj primerjali s Studentovim t-testom, pri čemer smo uporabili Bonferronijev popravek.

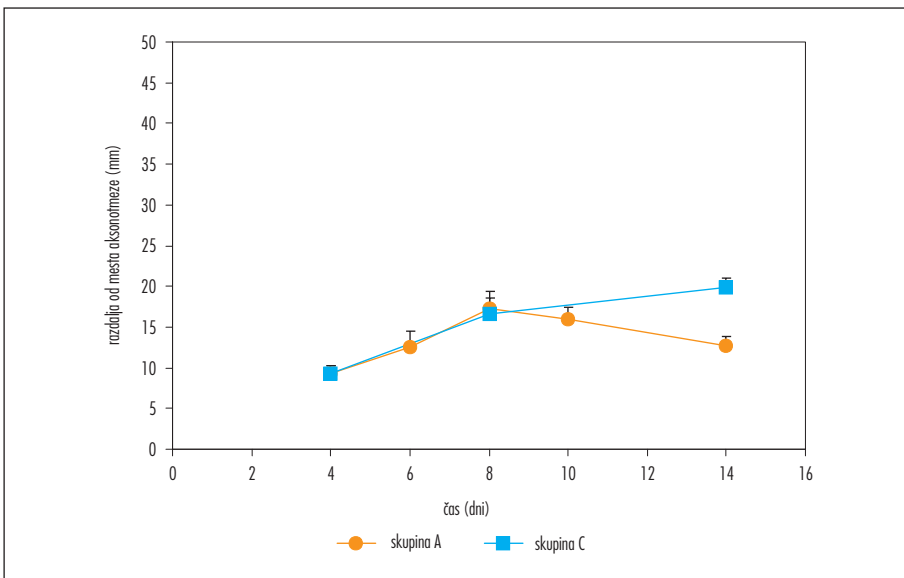
Regeneracija skozi brezcelični odsek živca, obložen z degeneriranim živčnim odsekom

V poskusni skupini D, kjer so aksoni rastle v zmrzovan distalni krn ob podpori topnih dejavnikov iz degeneriranega odseka *n. peroneusa*, s katerim

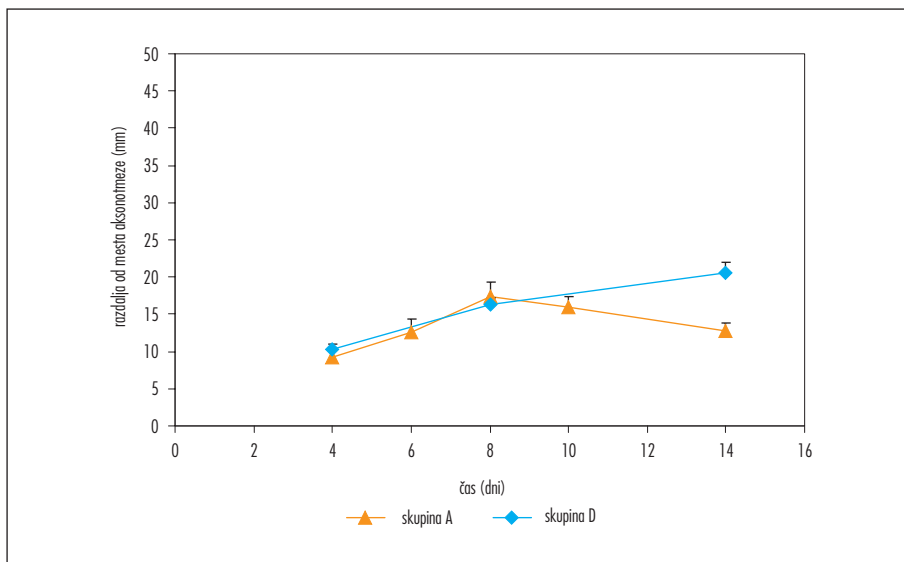


Slika 3. Regeneracija aksonov ob različno dolgih brezceličnih odsekih distalnega krna. Razdalje, ki so jih dosegli najhitrejši regenerirajoči se aksoni po aksonotmezi in zmrzovanju/odtajanju distalnega odseka suralnega živca, izmerjene s testom uščipa živca. Skupina A: zmrznjen celotni distalni odsek živca; skupina B1: zmrznjen 10 mm dolg odsek distalno od mesta aksonotmeze; skupina B2: zmrznjen 15 mm dolg odsek distalno od mesta aksonotmeze. Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni vzorcev ($n=4-6$ za vsak posamezni vzorec iz vsake skupine).

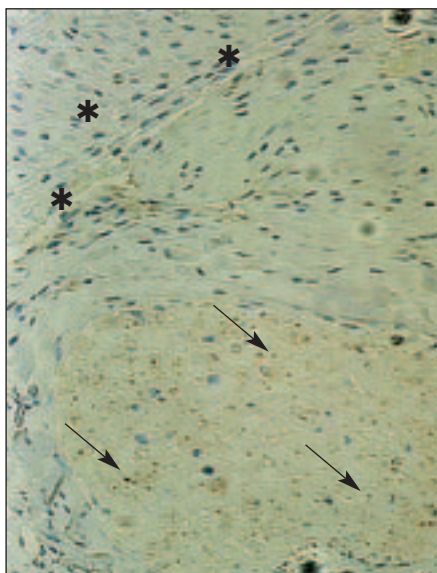
144



Slika 4. Regeneracija aksonov skozi zaporedno zmrzovani distalni odsek živca. Razdalje, ki so jih dosegli najhitrejši regenerirajoči se aksoni po aksonotmezi in zmrzovanju/odtajanju distalnega odseka suralnega živca, izmerjene s testom uščipa živca. Skupina A: zmrznjen celotni distalni odsek živca naenkrat; skupina C: najprej zmrznjen 18 mm dolg odsek distalno od aksonotmeze, nato čez štiri dni še preostali del distalnega segmenta. Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni vzorcev ($n=4-6$ za vsak posamezni vzorec iz vsake skupine).



Slika 5. Regeneracija aksonov skozi zmrzovani odsek živca ob podpori obloge iz degeneriranega odseka drugega živca. Razdalje, ki so jih dosegli najhitrejši regenerirajoči se aksoni po aksonotmezi in zmrzovanju/odtajanju celotnega distalnega suralnega živca, izmerjene s testom uščipa živca. Skupina A: zmrznjen celotni distalni odsek živca; skupina D: zmrznjen celotni distalni odsek živca, v dolžini 20 mm obložen z degeneriranim odsekom *n. peroneusa*. Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni vzorcev ($n=4-6$ za vsak posamezni vzorec iz vsake skupine).



Slika 6. *N. suralis* po osmih dneh regeneracije aksonov skozi brezcelični odsek, obložen z degeneriranim živčnim odsekom *n. peroneusa*. Prečni prerez živca skozi distalni krn. Prikaz imunohistokemične reakcije na neurofilament v aksonih. Puščice prikazujejo aksoni, vidne kot rjave pege. Jedra SC in fibroblastov v obloženem odseku *n. peroneusa*, vidna kot modre pege, so prikazana z zvezdicami.

je bil zmrzovani distalni krn obložen, razdalja, ki so jo aksoni dosegli 8. dan po aksonotmezi, ni bila statistično značilno različna od razdalje, dosežene 8. dan v skupini A ($p > 0,05$), 14. dan pa statistično značilno večja kot pri skupini A ($p < 0,005$). Razlika med razdaljama, doseženima 8. in 14. dne po poškodbi v sami skupini D je bila statistično značilna ($p < 0,05$) (slika 5). Vse razlike med dvema vzorcema smo med seboj primerjali s Studentovim t-testom, pri čemer smo uporabili Bonferronijev popravek.

V prečnem rezu živca, odvzetega osmega dne v oddaljenosti 15 mm distalno od mesta aksonotmeze, smo zasledili regenerirajoče se aksone le v *n. suralisu*. Degenerirani odsek *n. peroneusa*, ki obdaja *n. suralis*, ne vsebuje aksonov. Vidne so namnožene SC (slika 6).

RAZPRAVLJANJE

V pričujoči nalogi smo proučevali regeneracijo senzoričnih aksonov skozi brezcelični segment distalnega krna poškodovanega perifernega živca. Poskuse smo opravili na podganjem suralnem živcu, ki vsebuje več kot

95 % senzoričnih aksonov (54). Z zmrzovanjem suralnega živca distalno od mesta aksonotmeze smo uničili vse celice v tem odseku. S tem smo odstranili celično podporo regenerirajočim se aksonom, ohranjena pa je ostala kontinuiteta bazalnih lamin nevrilemskih cevok. Hitrost regeneracije senzoričnih aksonov smo zasledovali s testom uščipa živca.

Regeneracija senzoričnih aksonov skozi brezcelični odsek živca

Rezultati testa uščipa živca v poskusni skupini A (regeneracija skozi brezcelični odsek) so pokazali, da se po začetnem obdobju dokaj hitre rasti aksonov skozi brezcelični segment, torej brez celične podpore distalno od poškodbe, regeneracija upočasni. Hitrost rasti v prvih osmih dneh po poškodbi v našem poskusu se ujema z rezultati prejšnjih poskusov in je približno za 30 % manjša kot hitrost rasti senzoričnih aksonov v nezmrzovanih živcih (ob ohranjeni celični podpori v distalnem krnu), poškodovanih le z aksonotmezo (41, 55). Temu obdobju sorazmerne »odpornosti«
146
proti pomanjkanju živih celic v distalnem krnu je v drugem tednu sledil zastoj elongacije regenerirajočih se aksonov. V prvem tednu po aksonotmezi in zmrzovanju so v distalnem krnu ohranjene cevke BL, ki aksonom zagotavljajo ugodno rastno podlago (38, 41, 43). V odsotnosti SC, ki bazalno lamino nevrilemskih cevok v normalnem distalnem krnu tvorijo in obnavljajo (10), bi ustavev regeneracije lahko pripisali degeneraciji BL nevrilemskih cevok do take mere, da regenerirajoči se aksoni skozi ne morejo več rasti. Znano je namreč, da se rast regenerirajočih se aksonov skozi denaturirane nevrilemske cevke, v katerih so beljakovine BL denaturirane, zelo upočasni (41). Poleg sestavin ekstracelularnega matriksa imajo na rast aksonov ugoden vpliv tudi topni dejavniki SC (10, 56). Tudi na učinke teh dejavnikov na regenerirajoče se nevrone dolgotrajna odsotnost SC vpliva negativno, saj se morebitni učinki topnih dejavnikov v nekaj dneh po poškodbi iztrošijo. Aksoni v neprimernem mikrokoolju niso več sposobni rasti in se po ustavitvi začno celo umikati.

Regeneracija senzoričnih aksonov skozi 10 oz. 15 mm dolg brezcelični odsek živca

V skupini B smo z zmrzovanjem 10 oz. 15 mm dolgega distalnega odseka živca aksonom le začasno nudili slabše razmere za regeneracijo, ker smo v tem odseku odstranili celično podporo. Distalno od zmrzovanja so ostale SC ohranjene in so tako lahko distalno vzdrževale ugodno mikrokoolje za regenerirajoče se aksone, ki so prišli skozi brezcelični odsek živca. V prvem tednu aksoni 10 oz. 15 mm dolg brezcelični odsek namreč že prerastejo in bi v teh razmerah vstopili v odsek živca z živimi SC. Na ta način smo želeli preveriti hipotezo, da ustavev rasti aksonov v drugem tednu po poškodbi ni posledica trajnih sprememb v telesu nevrone, ki bi nastale med odsotnostjo podpore v prvem tednu, temveč odsev neugodnih razmer v mikrokoolju aksona. Rast aksonov v prvem tednu po aksonotmezi ni hitrejša kot rast skozi v celoti zmrznjen distalni odsek. Opazili pa smo, da lahko aksoni nemoteno rastejo skozi distalni krn živca, v katerem je bil narejen 10 oz. 15 mm dolg brezcelični odsek, tudi v drugem tednu po aksonotmezi, kar potrjuje našo hipotezo.

Regeneracija senzoričnih aksonov skozi zaporedno zmrzovani odsek živca

Z zaporednim zmrzovanjem živca distalno od aksonotmeze smo hoteli preveriti hipotezo, da lahko z ohranitvijo primerne rastne podlage vzdržujemo rast oz. preprečimo retrakcijo aksonov v drugem tednu po poškodbi tudi v popolni odsotnosti SC. Aksonom smo skušali ves čas regeneracije zagotoviti čim bolj svežo rastno podlago z dobro ohranjeno BL. Zatorej smo uporabili metodo zaporednega zmrzovanja, ko je prvemu zmrzovanju 18 mm dolgega odseka po štirih dneh sledilo zmrzovanje preostalega segmenta živca. S tem smo se vsaj delno izognili morebitni degeneraciji BL v drugem tednu po poškodbi, saj so aksoni v prvih osmih dneh že prerastli 18 mm dolg prvotno zmrzovani odsek in tako dosegli rastno podlago, ki je do tedaj degenerirala le štiri dni. To pomeni, da smo jim omogočili razmeroma ugodne razmere za regeneracijo do

12. dne po poškodbi. Dobljeni rezultati kažejo, da je primerna rastna podlaga pomemben dejavnik za vzdrževanje rasti aksonov, saj se je rast aksonov nadaljevala, čeprav počasneje, verjetno zaradi manj ugodnih razmer v zadnjih dveh dneh; tj. od 12. do 14. dne, ko se je morda celo ustavila. Čeprav so bili aksoni na ta način dva dni izpostavljeni slabšim razmeram, smo se za analizo rezultatov v 14. dnevu odločili zaradi primerjave s skupino A, kjer je 14. dne po poškodbi umik aksonov že zelo očiten. Menimo, da bi z izboljšanjem metode rast lahko še nadalje vzdrževali kljub odsotnosti SC. Veliko oviro v izvajanju poskusa nam je namreč predstavljalo zaporedno zmrzovanje, saj je pri velikem številu živali zaradi drugega zmrzovanja prišlo do poškodbe regenerirajočih se aksonov. Ta pojav vsekakor potrebuje še nadaljnje raziskovanje. Za drugo zmrzovanje v četrtem dnevu pa smo se odločili tudi zato, da bi se izognili ugodnemu vplivu topnih dejavnikov SC. Vemo namreč, da se povečana produkcija le-teh začne v SC v tretjem dnevu po poškodbi živca (1), kar smo z drugim zmrzovanjem in uničenjem SC preprečili.

Regeneracija senzoričnih aksonov skozi brezcelični odsek živca, obložen z degeneriranim živčnim odsekom

S poskusno skupino D, kjer so aksoni regenerirali skozi brezcelični odsek živca, obložen z degeneriranim živčnim odsekom z razmnožujočimi se SC, smo želeli preveriti pomen topnih dejavnikov SC za podaljšanje regeneracije skozi brezcelični odsek perifernega živca. Če topni dejavniki SC ne bi bili pomembni, bi pričakovali ustavitev rasti in retrakcijo aksonov kot v skupini A, vendar do tega v skupini D ni prišlo. Z oblogo iz degeneriranega živčnega odseka smo namreč regenerirajočim se aksonom vsaj delno zagotovili stalen vir topnih dejavnikov iz SC. Ti so zaradi okvarjene krvno-živčne pregrade prehajali iz obdajajočega degeneriranega odseka *n. peroneusa* v brezcelični segment *n. suralis*a (57). Odsek *n. peroneusa* je namreč vseboval žive SC, ki so se tretji dan po poškodbi začele bujno razmnoževati

in proizvajati topne rast spodbujevalne dejavnike (2), le-ti pa so verjetno omogočili aksonom *n. suralis*a uspešno regeneracijo kljub vedno slabši podlagi. Lahko bi rekli, da se je odpornost aksonov na poslabšanje kakovosti rastne podlage ob prisotnosti topnih dejavnikov iz SC povečala. Razdalja, ki so jo dosegli najhitrejši aksoni 14. dne, je bila občutno večja kot v skupini A, kjer dodatni vir topnih dejavnikov SC ni bil prisoten. Poskus tako potrjuje našo hipotezo, da je z dodajanjem topnih dejavnikov SC mogoče vzdrževati rast aksonov ob podaljšani regeneraciji skozi brezcelični odsek živca.

Iz rezultatov raziskave tako lahko vidimo, da imata tako rastna podlaga kot topni dejavniki SC velik pomen pri regeneraciji aksonov. Opazili smo, da se rast regenerirajočih se aksonov v drugem tednu po poškodbi ob poslabšanju rastne podlage in pomanjkanju topnih dejavnikov SC ustavi, čemur sledi retrakcija. Ob odsotnosti samo enega od obeh dejavnikov pa se elongacija aksonov v drugem tednu nadaljuje, čeprav se hitrost rasti precej upočasni, kar govori v prid hipotezi o komplemarnem vplivu rastne podlage in topnih dejavnikov na regeneracijo aksonov. To nas vodi v domnevo, da bi z uporabo kaderskih presadkov, kjer zaradi imunske reakcije rejernika pride do uničenja SC, ne pa tudi BL, lahko z dodajanjem topnih dejavnikov SC omogočili aksonom boljšo in trajnejšo rast. Morda bi na ta način lahko dosegli boljše rezultate tudi na kliničnem in ne samo na raziskovalnem področju.

ZAHVALA

Hvala ti, Fajko, za vse besede, utopljene v tvoji odlični kavi v dolgih nočeh. Hvala ti za prijateljstvo in hvala predvsem, ker si nama vztrajno kazal pot, pa čeprav sva se na njej ničkolikokrat izgubila. Za vse ostalo so besede premalo.

Hvala prof. Janezu Sketlju za mentorstvo.

Najlepša hvala vsem zaposlenim na PAFI-ju za prijaznost in strpnost.

In seveda, hvala Jani Založnik in Alenki Kljun iz Onkološkega inštituta za topel spremem in trud pri izdelavi preparatov.

LITERATURA

1. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989; 15: 513–29.
2. Lundborg G. Nerve regeneration problems in a clinical perspective. *Restor Neurol Neurosci* 1990; 1: 297–302.
3. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into the peripheral nervous system »bridges« after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1982; 214: 931–3.
4. Bisby MA. Regeneration of peripheral nervous system axons. In: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK, editors. *The axon: structure, function and pathophysiology*. New York: Oxford U Pr; 1995. pp. 553–8.
5. Raivich G, Kreutzberg G. Peripheral nerve regeneration: Role of growth factors and their receptors. *Int J Neurosci* 1993; 11: 311–24.
6. Waller AV. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produce thereby in the structure of the primitive fibres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1850; 140: 423.
7. Beuche W, Friede RL. The role of nonresident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 1984; 13: 767–96.
8. Perry VH, Brown MC. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1992; 2: 682–97.
9. Clarke D, Richardson P. Peripheral nerve injury. *Curr Opin Neurol* 1994; 7: 415–21.
10. Salonen V, Aho H, Roytta M, Peltonen J. Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropathol (Berlin)* 1988; 75: 331–6.
11. Heumann R, Korschnig S, Bantlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 1987; 104: 1623–31.
12. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates nerve growth factor (NGF) synthesis in the non-neuronal cells of the rat sciatic nerve. *Nature* 1987; 330: 658–9.
13. Golding JP, Zammit PS, Tonge DA. Effects of freezing a segment of peripheral nerve on subsequent protein release and axonal regeneration in the frog. *Exp Neurol* 1992; 118: 178–86.
14. Miyamoto Y, Higaki T, Sugita T, Ikuta T, Tsuge K. Morphological reaction of cellular elements and the endoneurium following nerve section. *Peripher Nerve Repair Regener* 1986; 3: 7–18.
15. Kerkhoff H, Jannekens FG. Peripheral nerve lesions: The neuropharmacological outlook. *Clin Neurol Neurosurg* 1993; 95 (Suppl): 103–8.
16. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 1951; 116: 321–61.
17. Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect* 1966; 60: 217–59.
18. Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev* 1968; 48: 534–69.
19. Thoenen H, Barde Y. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev* 1980; 60: 1284–335.
20. Johnson EM, Rich KM, Yip HK. The role of NGF in sensory neurons in vivo. *Trends Neurosci* 1986; 9: 33–7.
21. Lindsay RM. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal elongation but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci* 1988; 8: 2394–405.
22. Heumann R, Korschnig S, Scott J, Thoenen H. Relationship between the levels of nerve growth factor and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J* 1984; 3: 3183–9.
23. Korschnig B, Thoenen H. Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 3513–6.
24. Shelton DL, Reichardt LF. Expression of nerve growth factor gene correlates with density of sympathetic innervation in effector organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 105: 162–70.
25. Rich KM, Alexander TD, Pryor JC, Hollowel JP. Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers. *J Neurocytol* 1989; 18: 569–76.
26. Diamond J, Coughlin M, MacIntyre L, Holmes M, Visheau B. Evidence that endogenous nerve growth factor is responsible for collateral sprouting, but not the regeneration of nociceptive axons in adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6596–600.
27. Wright EM, Vogel KS, Davies AM. Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival. *Neuron* 1992; 9: 139–50.
28. Sara VR, Hall K, Mizaki M, Fryklund L, Christensen N, Wettenberg L. Ontogenesis of somatomedin and insulin receptors in the human fetus. *J Clin Invest* 1983; 71: 1084–94.
29. Kanje M, Skottner A, Sjöberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 1989; 486: 396–8.
30. Sjöberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) as a stimulator of regeneration in freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res* 1989; 485: 102–8.
31. Curtis R, Scherer SS, Somogyi R, Adryan KM, Ip NY, Zhu Y, Lindsay RM, DiStefano PS. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron* 1994; 12: 191–204.

38. Ide C, Tohyama K, Yokota R, Nitatori T, Onodera S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* 1983; 288: 61-75.
39. Ide C, Osawa T, Tohyama K. Nerve regeneration through allogenic nerve grafts with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Prog Neurobiol* 1990; 34: 1-38.
40. Bunge MB, Bunge RP, Kleitman N, Dean AC. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and neurite regeneration. *Dev Neurosci* 1989; 11: 348-60.
41. Sketelj J, Bresjanac M, Popović M. Rapid growth of regenerating axons across segments of sciatic nerve devoid of Schwann cells. *J Neurosci Res* 1989; 24: 153-62.
42. Wang GY, Hirai KI, Shimada H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum treated nerve grafts. *Brain Res* 1992; 570: 116-25.
43. Wang GY, Hirai KI, Shimada H, Taji S, Zhong SZ. Behavior of axons, Schwann cells and perineural cells in nerve regeneration within transplanted nerve grafts: effects of anti-laminin and anti-fibronectin antisera. *Brain Res* 1992; 583: 216-26.
44. Reichard LF, Bixby JL, Hall DE, Ignatius MJ, Neugebauer KM, Thomaselli KJ. Integrins and cell adhesion molecules: neuronal receptors that regulate axon growth on extracellular matrices and cell surfaces. *Dev Neurosci* 1989; 11: 332-47.
45. Letourneau PC. Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev Biol* 1978; 66: 183-96.
46. Tomaselli KJ, Reichardt LF, Bixby JL. Distinct molecular interactions mediate neuronal process outgrowth on non-neuronal cell surfaces and extracellular matrices. *J Cell Biol* 1986; 103: 2659-72.
47. Gundersen RW. Response of sensory neurites and growth cone to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev Biol* 1987; 121: 423-31.
48. Hall SM. The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the reinnervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986; 12: 401-14.
49. Nadim W, Anderson PN, Turmaine M. The role of Schwann cells and basal lamina tubes in the regeneration through long lengths of freeze-killed nerve grafts. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990; 16: 411-21.
50. Fugleholm K, Schmalbruch H, Krarup C. Early peripheral regeneration after crushing, sectioning and freeze studied by implanted electrodes in the cat. *J Neurosci* 1994; 14: 2659-73.
51. Srpčič M. Regeneracija poškodovanega perifernega živca podgane brez celične podpore distalno od mesta poškodbe. *Raziskovalna naloga*. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1998.
52. Anderson PN, Mitchell J, Mayor D, Stauber VV. An ultrastructural study of the early stages of axonal regeneration through rat nerve grafts. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1983; 9: 455-66.
53. Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986; 12: 27-46.
54. Bajrović F, Bresjanac M, Sketelj J. Long-term effects of deprivation of cell support in distal stump on peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res* 1989; 39: 23-30.
55. Remškar M. Vpliv predhodnega kolateralnega brstenja aksonov na hitrost njihove regeneracije po poškodbi. *Raziskovalna naloga*. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1995.
56. Labrador RO, Buti M, Navaro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 1998; 141: 243-52.
57. Sjöberg J, Kanje M, Edström A. Influence of non-neuronal cells on regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 1988; 453: 221-6.

Prispelo 15. 12. 1999