

# HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE I VOLUMENSKA GUSTINA ELASTIČNIH VLAKANA U DERMU TOKOM STARENJA

## AUTORI

Leštarević Snežana<sup>1</sup>, Mandić Predrag<sup>2</sup>, Mijović Milica<sup>3</sup>, Dejanović Mirjana<sup>4</sup>, Marjanović Dragan<sup>5</sup>, Matejić Suzana<sup>6</sup>, Filipović Milan<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

<sup>2</sup> Institut za anatomiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

<sup>3</sup> Institut za patološku anatomiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

<sup>4</sup> Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

<sup>5</sup> Stomatološka klinika, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

<sup>6</sup> Institut za sudsku medicinu, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

<sup>7</sup> Klinika za hirurgiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovska Mitrovica

## KORESPONDENT

Snežana Leštarević

Institut za histologiju i embriologiju  
Medicinski fakultet  
Univerziteta u Prištini  
Kosovska Mitrovica, Srbija  
snezana.lestarevic@med.pr.ac.rs

## SAŽETAK

**Uvod:** Elastična vlakna su jedan od konstituenata ekstracelularnog matriksa derma koji presudno utiče na histoarhitekturu dermalnog veziva. Tokom starenja kože dolazi do promena u organizaciji i gustini elastičnih vlakana.

**Cilj rada** je utvrđivanje sličnosti i razlika između foto- i hronostarenja kože kroz praćenje načina organizacije i kvantifikaciju elastičnih vlakana u dermu.

**Materijal** su činili uzorci fotoekspozirane i fotoneekspozirane kože 90 kadavera starosti između 0 i 82 godine, razvrstani u pet uzrasnih grupa: novorođenčad, rano životno doba, srednje životno doba, pozno životno doba i najstariji. Uzorci kože bojeni su metodom Aldehid fuchsin bojenja (Halmi modifikacija), kao i Alcian blue bojenjem, po metodi Spicera, a volumenska gustina (VG) elastičnih vlakana merena je u programu Image J.

**Rezultati:** U koži novorođenčadi i mladih (vrat i trbuh) elastična vlakna formiraju mrežu uređene strukture. U grupi poznog životnog doba i najstarijih, na fotoekspoziranoj koži, postoji tendencija ka fragmentaciji elastičnih vlakana i nagomilavanju elastotičnog materijala. VG elastične mreže u koži vrata srednjeg životnog doba ima vrednost  $3,66 \pm 0,28\%$  i veća je u odnosu na kožu trbuha. Vrednost VG elastične mreže kože vrata u poznom životnom dobu je  $5,61 \pm 0,22\%$  i viša je od VG elastičnih vlakana u koži trbuha. Koža najstarijih ima veće vrednosti VG elastičnih vlakana u vratu  $6,24 \pm 0,21\%$  u odnosu na trbuh -  $2,67 \pm 0,10\%$ . Evidentirano je i statistički značajno povećanje VG elastične mreže u koži vrata, kao i statistički značajno smanjenje VG elastične mreže u koži trbuha, tokom starenja (srednje životno doba - najstariji).

**Zaključak:** Korelacija organizacije i zastupljenosti elastičnih vlakana sa uzrastom razlikuje se na fotoekspoziranoj i fotoneekspoziranoj koži. Kvantitativna evaluacija volumenske gustine elastičnih vlakana može biti u korelaciji sa klinički iskazanim znacima fotostarenja, pre svega solarne elastoze.

**Ključne reči:** elastična vlakna, fotostarenje, koža

## ENGLISH

### HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS AND VOLUME DENSITY OF ELASTIC FIBERS IN THE DERMIS DURING AGING

Leštarević Snežana<sup>1</sup>, Mandić Predrag<sup>2</sup>, Mijović Milica<sup>3</sup>, Dejanović Mirjana<sup>4</sup>, Marjanović Dragan<sup>5</sup>, Matejić Suzana<sup>6</sup>, Filipović Milan<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>2</sup> Institute of Anatomy, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>3</sup> Institute of Pathology, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>4</sup> Institute of Physiology, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>5</sup> Dental Clinic, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>6</sup> Institute of Forensic Medicine, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>7</sup> Surgery Clinic, Medical Faculty, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia

## SUMMARY

**Introduction:** Elastic fibers are constituents of the dermal extracellular matrix, determining the histoarchitecture of the dermal connective tissue. Organization and density of elastic fibers change as skin ages.

**The aim** of this paper was to determine the similarities and differences between the photo-aging and the physiological aging of skin by examining organization and quantifying the elastic fibers in the dermis during aging.

**The material** included samples of photoexposed and photoprotected skin, obtained from 90 cadavers aged 0-82 years. The samples were classified into five age groups: newborns, young age, middle age, mature age and the oldest age. Skin samples were stained using the Halmi modification of Aldehyd fuchsin staining method, as well as Alcian blue staining (the Spicer method). Volume density (VD) of the elastic fibers was measured using Image J program.

**Results:** In the skin of newborns and young age group (neck and abdomen) elastic fibers appeared to form a network structure. In the photoexposed skin of the mature age and the oldest group, elastic fibers showed tendency to fragment, while the elastic material exhibited tendency to accumulate. VD of elastic network in the skin of the neck in the middle, mature and the oldest age group was greater than VD of abdominal skin of the respective age groups ( $3.66 \pm 0.28\%$ ,  $5.61 \pm 0.22\%$ ,  $6.24 \pm 0.21\%$  respectively). Age-related statistically significant increase in VD of the elastic network in the skin of the neck, as well as a statistically significant reduction of elastic network VD in the abdominal skin, has been observed (middle age - oldest).

**Conclusion:** Correlation of the organization and quantity of elastic fibers with age exhibits different pattern in photoexposed compared to photoprotected skin. A quantitative evaluation of the volume density of elastic fibers correlates with clinically visible signs of photo-aging, primarily with solar elastosis.

**Key words:** elastic fibers, photo-aging, skin

## UVOD

Ekstracelularni matriks (ECM) u dermisu je kompleksan visokohidratirani gel u kome su udruženi elementi osnovne supstance - glikozaminoglikani, proteoglikani i glikoproteini sa kolagenim i elastičnim vlaknima, kao i ćelijama epitelnog i vezivnog tkiva [1]. Elastična vlakna su integralna komponenta ECM-a od koje zavisi elastičnost tkiva i organa. Tanja su od kolagenih vlakana i obično su isprepletana sa njima [2]. Predstavljaju relativno minornu strukturnu komponentu dermisa sa učešćem od svega 2-4% u fotozaštićenoj koži odraslih, ali neophodnu za njenu funkciju. Elastična vlakna se sastoje od mikrofibrila koji čine osnovu vlakna između kojih se deponuju molekuli elastina amorfno izgleda [3]. Elastin je protein, a mikrofibrili su niti dijametra 10 nm, izgrađene od glikoproteina fibrilina [2] koje u toku elastogeneze prve nastaju [4].

Elastična vlakna stvaraju finu mrežu kroz čitav dermis, izgrađenu od tri vrste vlakana-oksitalanskih, elauin-skih i elastičnih. Oksitalanska vlakna vezuju se jednim krajem za bazalnu laminu i perpendikularno prolaze kroz papilarni dermis da bi se drugim krajem vezala za horizontalno postavljena elauin-ska vlakna, dok se elauin-ska vlakna postepeno utapaju u zrela elastična vlakna koja se između snopova kolagenih vlakana pružaju kroz čitav retikularni sloj dermisa [5].

Elastin, komponenta matriksa elastičnih vlakana, nastaje od sekretovanog, rastvorljivog prekursora, molekula tropoelastina (molekulska masa 70kDa), koga proizvode fibroblasti u vezivnom tkivu i glatke mišićne ćelije u krvnim sudovima. Tropoelastin se polimerizuje i nastaje amorfni glikoprotein sličan gumi, elastin koji preovladava u zrelih vlaknima [6]. Veliki broj drugih molekula, uključujući vitronektin, faktor ubrzavanja degradacije i fibronektin, su takođe povezani sa elastičnim vlaknima u koži [7,8].

Metabolički obrt proteina vezivnog tkiva, a posebno elastina, relativno je spor u poređenju sa ostalim proteinima. „Turnover“ elastičnih vlakana u dermisu je u normalnim uslovima veoma spor, ali može biti ubrzan pod uticajem UV zračenja i inflamacije. Tkiva koja sadrže elastin u svom sastavu imaju i proteolizne enzime koji konstantno razgra-

đuju jedan deo elastina, a koji kasnije biva zamenjen novosintetisanim molekulima. U klasične elastaze spadaju serin proteaze. Ostali enzimi spadaju u metaloproteinaze, zahtevajući kalcijum za svoju aktivnost [7].

Hronična ekspozicija Suncu uzrokuje promene u dermu koje se najkarakterističnije evidentiraju na konstituentima ECM-a, u vidu narušavanja integriteta genoma, nastanku fotostarenja i karcinogenezi kože [1,9]. Preterano izlaganje zračenju dovodi do gubitka vitalnosti ćelija, oštećenja ćelijske membrane i akumulacije elastičnog materijala koji zamenjuje normalan kolagen, rezultirajući modifikovanom arhitektonskom strukturom kože oštećene Suncem, poznatom kao solarna elastoza [10]. Glavni patohistološki supstrat fotostarenja predstavlja akumulacija elastičnog materijala, koja nastaje usled poremećaja sinteze i/ili razgradnje elastičnih vlakana [11]. Razgradnja elastina može biti povezana sa različitim patološkim stanjima, a dermalna elastoza predstavlja primarno obeležje fotooštećene kože [12].

Degradacija makromolekula ECM-a i pojava solarne elastoze povećavaju rizik od razvoja karcinoma [1].

## CILJ RADA

Morfometrijska evaluacija kvalitativnih i kvantitativnih alteracija elastične mreže u dermu fotoekspozirane i fotonekspozirane kože, tokom starenja.

## MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obavljeno na Institutu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Prištini/Kosovskoj Mitrovici, Institutu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Prištini/Kosovskoj Mitrovici, Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu i Institutu za sudsku medicinu u Nišu u periodu od 2011. do 2015. godine.

Materijal su činili uzorci kože 90 kadavera starosti između 0 i 82 godine. Cilindričnom (punch) tehnikom, sa kože

kadavera uzimani su blokovi tkiva, prečnika 4,0 mm i to sa prednje strane vrata (na mestu gde počinje rutinski ili klasični prednji rez kod autopsije), kao i sa prednje strane trbuha (mesto gde se prednji rez završava). Od svakog kadavera uzimana su po dva tkivna isečaka, uvek na isti način, uz gotovo neprimetno remećenje integriteta kože, u skladu sa saglasnošću dobijenom od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta u Kosovskoj Mitrovici. Nakon ekscizije tkivni uzorci su stavljeni u 10% pufervisani formalin. Bočice sa formalinom i uzorcima obeležavane su rednim brojevima koji odgovaraju rednim brojevima kadavera, kao i oznakama V ili T, u zavisnosti da li je uzorak koža vrata ili trbuha.

Uzorci kože razvrstani su u pet uzrasnih grupa:

- a) Kontrolnu grupu (0 grupa) činili su isečci kože fetusa i donešene novorođenčadi, kod kojih ne postoji razlika u histološkoj građi između fotoekspoziranih i fotoneekspoziranih regija. Kontrolnu grupu činilo je 10 biopsija.
- b) Uzorci kože osoba uzrasta od 1. do 20. godine života (1. grupa) činili su grupu ranog životnog doba. Ova grupa obuhvatila je 20 biopsija.
- c) Uzorci kože osoba uzrasta od 21. do 40. godine života (grupa srednjeg životnog doba-2. grupa). Ova grupa obuhvatila je 20 biopsija kože.
- d) Uzorci kože osoba uzrasta od 41. do 60. godine života (grupa poznog životnog doba-3. grupa). Istraživanjem je obuhvaćeno 20 uzoraka.
- e) Grupu najstarijih činili su uzorci kože osoba starijih od 60 godina (4. grupa). Ukupno je analizirano 20 uzoraka.

Nakon fiksacije tkivni isečci su dehidratirani u rastućim koncentracijama alkohola, prosvetljeni u ksilolu i kalupljeni u parafinu. Od parafinskih blokova pravljani su serijski preseki debljine 5  $\mu$ m na klizećem Reichertovom mikrotomu. Za opšti uvid u histološku strukturu kože korišćeni su isečci bojeni rutinskom histološkom tehnikom hematoksilin-eozinom [13]. Detekcija elastičnih vlakana je vršena metodom bojenja po *Spiceru* i modifikovanim *Aldehyd fuchsina* bojenjem (*Halmi* modifikacija *Gomori* metode) [14].

Preparati su analizirani na mikroskopu marke Krüss, nemačke proizvodnje, a slikani su okularnom kamerom marke OPLENIC *Pro-MicroScan high resolution* USB 2.0 na uvećanjima 40X, 100X i 400X, sa dodatnim uvećanjem kamere od 4X.

Kompjuterska analiza fotografija (određivanje volumenske gustine elastičnih vlakana) rađena je korišćenjem softverskih programa *Image tool 3.0* i *Image J* za analizu digitalnih slika, dostupnih na internet adresi: <http://rsb.info.nih.gov/ij>.

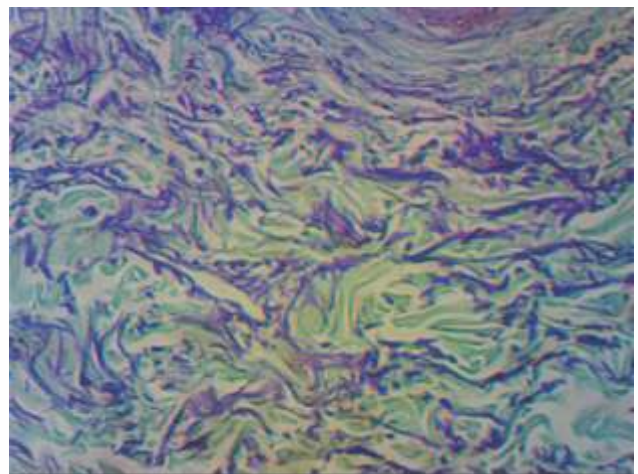
Statistička analiza sprovedena je pomoću računara uz pomoć programa *MedCalc version 13.1.2.0*. Kontinualni (merljivi) parametri predstavljeni su kao: srednja vrednost ( $X$ ) i standardna devijacija ( $SD$ ). Testiranje statističke značajnosti razlike srednjih vrednosti između grupa kod kontinualnih ispitivanih parametara vršeno je primenom Studentovog  $t$ -testa za nezavisne uzorke.

Kao mera statistički značajne razlike prihvaćeni su standardni nivoi značajnosti testova označeni sa:  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ .

## REZULTATI

Elastična vlakna čine posebnu vrstu fibrilarnih proteina sa specifičnom strukturom koja je određena prisustvom dominantne amorfne komponente (elastina) i fibrilina 1 i 2, glikoproteina koji predstavljaju glavnu komponentu mikro-fibrila. U našem istraživanju, za identifikaciju elastičnih vlakana koristili smo histohehemijsku metodu modifikovanog *Aldehyd fuchsina* bojenja tzv. *Halmi* modifikaciju metode *Gomori* (Af-H-LG), u kojoj se koristi aldehyd fuksin sa lajt grinom (light green) ili narandžastom G (orange G) kao kontrabojenjem. Ovim bojenjem kolagen i bazalna membrana se boje zeleno, a mastociti, elastična vlakna, kao i peharaste ćelije (sluz), ljubičasto. Korišćenjem polivalentne bazne boje, alcijan plavo (alcian blue), po metodi *Spicera*, kojom smo detektovali mastocite, dobro se boje i elastična vlakna, pa smo i ovako obojene uzorke koristili za histološku analizu.

Pri analizi tkivnih uzoraka praćen je način organizacije elastičnih vlakana, njihova gustina, dužina, debljina, vijugavost, odnosno upoređivana je struktura, organizacija i gustina elastičnih vlakana između grupa. U koži novorođenčadi i mladih, uočeno je da elastična vlakna formiraju finu mrežu, uređene strukture. Elastična vlakna u papilarnom dermisu su tanka, orijentisana u nekoliko pravaca, dobre i ujednačene prijemčivosti za boju. Dominiraju vlakna koja su paralelna površini kože. U retikularnom dermisu, elastična vlakna su nešto deblja i duža, talasasta i raspoređena paralelno sa površinom kože (slika 1).

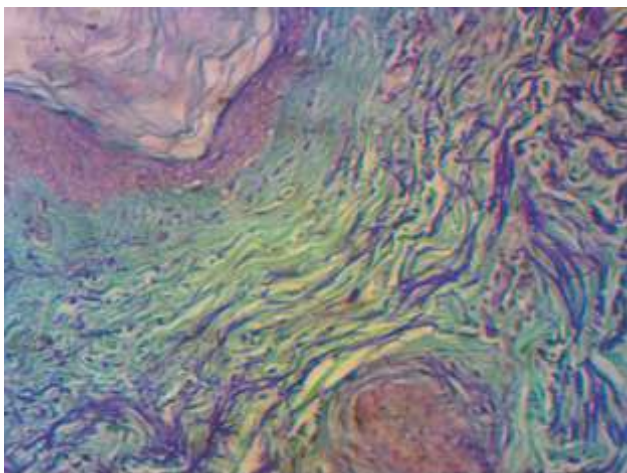


Slika 1. Debeli elastična vlakna smeštena su u donjem delu dermisa i aranžirana su slično snopovima kolagenih vlaknana, paralelno sa površinom kože. Muškarac, 17g, koža vrata. *Spicer* 100X, kamera 4x.

Koža srednjeg životnog doba ima sličan raspored elastičnih vlakana kao i koža mladih. U papilarnom dermisu se vidi fina mreža izgrađena od tankih vlakana, orijentisanih u nekoliko pravaca, dobre i ujednačene prijemčivosti za boju. U retikularnom dermisu, elastična vlakna su deblja, duža i talasasta, raspoređena paralelno sa površinom kože (slika 2). Diskretne promene registrovali smo na 3 uzorka kože vrata u vidu fokalnih nakupina, promenjenih elastičnih vlakana u retikularnom dermu.

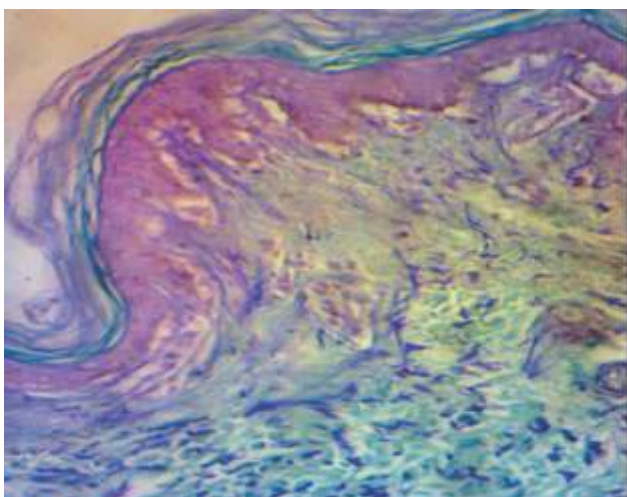


U grupi poznog životnog doba i grupi najstarijih, na fotoekspoziranoj koži, postoji tendencija ka fragmentaciji elastičnih vlakana, kako na nivou papilarnog, tako i na nivou retikularnog dermisa. Kod osoba poznog životnog doba, papilarni dermis gubi finu mrežu elastičnih vlakana, koja se postepeno proređuje. Pojavljuju se fragmentovana vlakna, smanjenog afiniteta za boje, čak i kvantitativno manjeg obima (slika 3).



*Slika 2. Blago talasasta elastična vlakna se u gornjim slojevima dermisa pružaju u raznim smerovima. Muškarac, 38g, koža trbuha. Spicer, 40x, kamera 4x.*

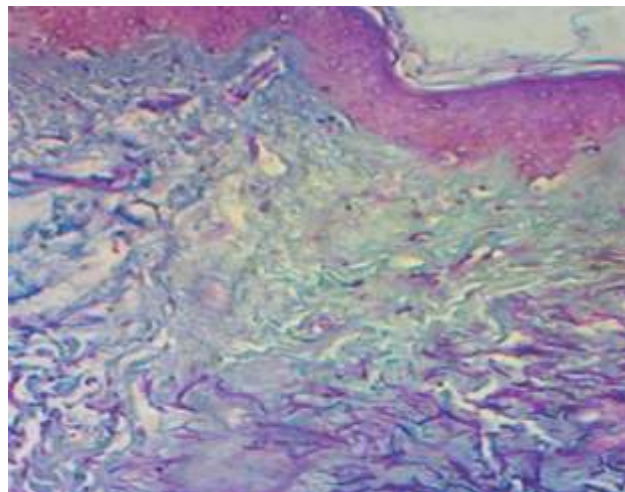
U grupi poznog životnog doba i grupi najstarijih, na fotoekspoziranoj koži, postoji tendencija ka fragmentaciji elastičnih vlakana, kako na nivou papilarnog, tako i na nivou retikularnog dermisa. Kod osoba poznog životnog doba, papilarni dermis gubi finu mrežu elastičnih vlakana, koja se postepeno proređuje. Pojavljuju se fragmentovana vlakna, smanjenog afiniteta za boje, čak i kvantitativno manjeg obima (slika 3).



*Slika 3. Gruba, fragmentisana, mestimično zrnasto-brojčaničasta vlakna u retikularnom dermu. Muškarac, 67g, koža vrata. Spicer 40x, kamera 4x.*

Promene se javljaju u retikularnom dermisu gde elastična vlakna imaju tendenciju ka postepenom zgušnjavanju, a istovremeno se evidentira i proces elastolize. Elastoliza je na početku diskretna, ali sa starenjem progredira, tako da je vidljiva u gotovo svim uzorcima najstarijih. Fragmentacija elastičnih vlakana je izraženija u grupi najstarijih

mada se na nekim uzorcima vide i relativno izdužena vlakna. Istovremeno, postoji i izraženije zadebljanje elastičnih vlakana i to obe grupe: i fragmentovanih i onih koji zadržavaju određenu fibrilarnu strukturu. Fragmentacija izgleda zahvata gotovo sva vlakna, tako da u grupi starih uzorci kože sadrže fragmentovana vlakna sa sniženim afinitetom za boje. Ovo može značiti da ova vlakna pored fragmentacije trpe i neke strukturne modifikacije i gube svoju klasičnu strukturu (slika 4).



*Slika 4. Potpuno lizirana vlakna u najvećem delu derma. Muškarac, 81g, koža vrata. Aldehid fuchsin, 40x, kamera 4x.*

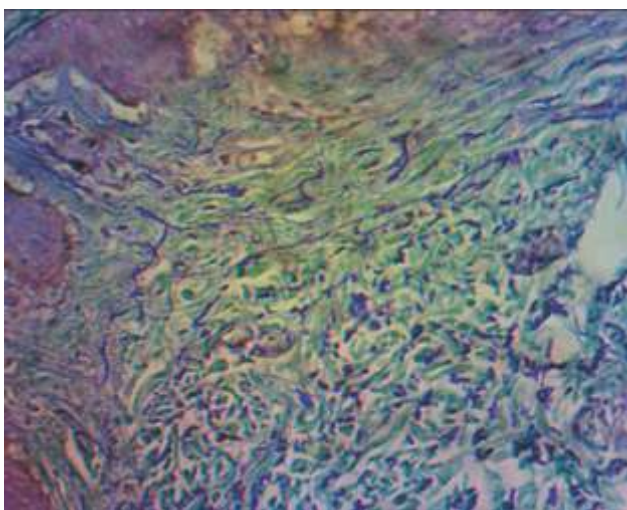
Pri fotostarenju javljaju se akumulacije izmenjenih elastičnih vlakana koje zauzimaju različite delove derma, a najčešće je to na granici papilarnog i retikularnog derma. Na preparatima kože sa regije vrata, osoba srednjeg životnog doba, znake početne solarne elastoze uočili smo kod 3 uzorka. U grupi poznog životnog doba, različite forme solarne elastoze imalo je 12 uzoraka, a u grupi najstarijih, kod 14 uzoraka istraživane kože uočili smo neke elemente umerene i izražene elastoze (slika 5).



*Slika 5. Akumulacije izmenjenih elastičnih vlakana u retikularnom dermu. Solarne elastoze. Muškarac, 81g, koža vrata. Af-H-LG 40x, kamera 4x.*

U fotoneekspoziranoj koži grupe poznog i najstarijeg životnog doba, promene su daleko suptilnije, nego na fotoekspoziranoj koži. Zapaža se opšta redukcija i

fragmentacija elastičnih vlakana u papilarnom i retikularnom dermu. Nema nakupina debelih, isprepletanih vlakana koje predstavljaju elastozni materijal (slika 6).



Slika 6. Redukcija elastičnih vlakana. Fragmentacija vlakana u retikularnom dermisu. Žena, 69g, koža trbuha. Af-H-LG, 40x, kamera 4x.

Stereološkim istraživanjem i statističkom obradom podataka nađeno je da razlike u VG elastične mreže između kože vrata i trbuha novorođenčadi i grupe ranog životnog doba nisu statistički signifikantne. VG elastične mreže, u koži vrata grupe srednjeg životnog doba, ima vrednost  $3,66 \pm 0,28\%$  i značajno je veća u odnosu na kožu trbuha ( $p < 0,001$ ). Vrednost VG elastične mreže kože vrata u poznom životnom dobu je  $5,61 \pm 0,22\%$  i značajno je viša od VG elastičnih vlakana u koži trbuha  $3,01 \pm 0,18\%$  ( $p < 0,001$ ). Koža najstarijih ima značajno veće vrednosti VG elastičnih vlakana u vratu  $6,24 \pm 0,21\%$  u odnosu na kožu trbuha  $2,67 \pm 0,10\%$  ( $p < 0,001$ ). Takođe je evidentirano statistički značajno povećanje VG elastične mreže u koži vrata, tokom starenja, kao i statistički značajno smanjenje VG elastične mreže u koži trbuha, tokom starenja (odnos srednje životno doba-najstariji) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. VG elastičnih vlakana u koži vrata i trbuha u odnosu na životno doba

Grupa	N (br.biopsija)	Koža vrata (%)		Koža trbuha (%)		
		$\bar{X}$	SD	vrat vs trbuh	$\bar{X}$	SD
0 grupa (fet / d.nov)	10	2.11	0.18		1.97	0.11
1. grupa (od 1. do 20. god) (rano životno doba)	20	3.07 a**	0.21		2.98 a**	0.16
2. grupa (od 21. do 40. god) (srednje životno doba)	20	3.66 b***	0.28	***	3.27 b*	0.24
3. grupa (od 41. do 60. god) (pozno životno doba)	20	5.61 c***	0.22	***	3.01 c*	0.18
4. grupa (preko 60 godina) (najstarije životno doba)	20	6.24 d**	0.21	***	2.67 d***	0.10

\* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$   
a - vs novorođenčad, b - vs rano.ž.d, c - vs srednje ž.d, d vs pozno ž.d.

## DISKUSIJA

Uzrasno starenje povezano je sa gubitkom elastičnih vlakana bilo usled proteolitičke degradacije ili snižene sinteze elastina. Suprotno, pri fotostarenju u srednjem delu derma se nakupljaju masivni depoziti elastina koji su izgubili svoje funkcionalne karakteristike. Solarna elastoza je

specifična promena u dermu karakteristična za fotostarenje kože koja se javlja nakon hronične ekspozicije UV zračenju [15]. U standardnim preseccima kože sa kliničkim znacima hroničnog solarnog oštećenja, bojenim na (HE), elastozni materijal se boji bazofilnije, ne pokazuje uobičajenu fibrilarnu građu, podseća na „iseckane špagete“ ili je u vidu homogene, gotovo hrskavičave mase [16]. Patogeneza solarne elastoze je složena i nije u potpunosti razjašnjena. Brojne dosadašnje studije (na životinjskim modelima, ćelijskim kulturama, biopsijama ljudske kože itd.) pokazale su da se elastični material u velikoj meri sastoji od abnormalnog tkiva koje ima nekoliko osobina normalnog elastičnog tkiva (npr. karakteristike bojenja i odgovor na različite enzime). Ostaje da se utvrdi da li je elastični materijal proizvod sinteze abnormalnih fibroblasta ili je u pitanju isključivo degeneracija elastičnih i kolagenih vlakana. Na ovo pitanje nauka još uvek nije dala pravi odgovor, uprkos brojnim istraživanjima koja su vršena tokom više od 100 godina [17]. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da u koži novorođenčadi i mladih, na vratu i trbuhu, elastična vlakna formiraju finu mrežu, uređene strukture, koja ostaje sve do 40 godina starosti. Međutim, diskretne promene registrovali smo na 3 uzorka kože vrata, srednjeg životnog doba, u vidu fokalnih nakupina promenjenih elastičnih vlakana u retikularnom dermu. U grupi poznog životnog doba i grupi najstarijih, na fotoekspoziranoj koži, uočavaju se vidljiviji znaci elastoze, koji postaju sve izraženije sa starenjem. Papilarni dermis gubi finu mrežu elastičnih vlakana koja se postepeno proređuje, a pojavljuju se fragmentovana vlakna, smanjenog afiniteta za boje, kvantitativno manjeg obima. Promene se javljaju i u retikularnom dermisu gde elastična vlakna imaju tendenciju ka postepenom zgušnjavanju. Fragmentacija elastičnih vlakana postaje sve izraženija tokom starenja, a istovremeno postoji i obimnije zadebljanje elastičnih vlakana i to obe grupe: i fragmentovanih i onih koji zadržavaju određenu fibrilarnu strukturu. Zapaža se akumulacija dezorganizovanog elastičnog materijala u retikularnom dermu.

Zapažanje slično našem iznose i drugi autori koji ističu da u fotoekspoziranoj koži dolazi do kvantitativnih i kvalitativnih promena elastičnih vlakana tokom starenja i da je postepena akumulacija elastina praćena postepenom redukcijom kolagenih vlakana. Zaključuju da područja u kojima je odsutan obojeni kolagen u dermisu izrazito koreliraju sa mestima gde dominira elastični materijal [18]. Slična zapažanja izneli su ranije Bernstein i sar. [19] ukazujući da je normalna aktivnost dermalnih fibroblasta da sintetišu elastin, uzrok povećanja elastičnog tkiva, ali ne i razlog za njegovu aberantnu morfologiju. Poput kolagena i elastin podleže neprestanom procesu remodelovanja. Ovaj proces je znatno sporiji, a ključni enzim u degradaciji elastina je elastaza [20]. Mehanizmi koji dovode do promena na elastičnim vlaknima još uvek nisu dovoljno proučeni, ali se zna da pored elastaze u njihovoj degradaciji mogu učestvovati i matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-12 [21, 22].

U našoj studiji zapazili smo da se pri fotostarenju javljaju akumulacije izmenjenih elastičnih vlakana koji uzimaju različite delove derma, a najčešće je to na granici papilarnog i retikularnog derma. U preparatima kože sa regije vrata osoba poznog i najstarijeg životnog doba, veliki broj istraživanih uzoraka pokazivao je neke elemente umerene ili izražene solarne elastoze. Merenjem VG elastičnih vlakana utvrdili smo da u fotoekspoziranoj koži osoba srednjeg, poznog i najstarijeg životnog doba postoji statistički signifikantno veća količina elastičnih vlakana, u odnosu na fotonekspoziranu kožu ovih grupa. I drugi autori navode



da se pri fotostarenju javljaju akumulacije izmenjenih elastičnih vlakana koje zauzimaju različite delove derma i koje ustvari reprezentuju solarnu elastožu. Ove akumulacije su obično na granici papilarnog i retikularnog derma, a kod uzrasnog starenja ih nema [23].

Pri tumačenju vrednosti VG elastičnih vlakana treba uzeti u obzir i činjenicu da su u elastozi vlakna izmenjena, što u značajnoj meri može umanjiti ili uvećati vrednost VG elastičnih vlakana, u zavisnosti od toga da li se pogoci na testnom sistemu na elastožno izmenjenu homogenu masu računaju ili ne. Mi smo u našem istraživanju te pogotke računali. Zapravo, može se pretpostaviti da apsolutna količina elastičnih vlakana može biti manja ili veća od njihove zapreminske gustine, u zavisnosti da li se elastože prihvata ili ne kao izmenjena elastična mreža.

Akumulacija abnormalnih elastičnih vlakana na fotoneksponiranoj koži bila je dokumentovana u brojnim istraživanjima, uključujući Seite i sar. [24] koji su ustanovili da nakon zadebljanja oštećenih delova elastične mreže vlakana i direktne interakcije lizozima sa elastazom, lizozim prevenirana degradaciju elastina, dovodeći do njegovog većeg nakupljanja i pojave elastoze. Primarna reakcija elastičnih vlakana na dejstvo UV zračenja je njihova hiperplazija. U fotoostareloj koži koja je više puta, ponovljeno izlagana zračenju dolazi do nastanka degenerativnih promena na elastičnim vlaknima, sa posledičnim smanjenjem njihove elastičnosti i rezistencije [25, 26] kao i formiranje tzv. elastožnog materijala [27]. Tada je u dermu prisutna masa degradiranih elastičnih vlakana u vidu amorfno materijala koji se sastoji od neorganizovanog tropoelastina i fibrilina [28] uz četverostruko povećanje sadržaja dezmozina [29]. U solarno oštećenoj koži, poremećen integritet elastične mreže u dermu može nastati usled povećane sinteze elastičnih vlakana, što potvrđuju povećani nivoi informacione RNK (iRNK) za elastin i informacione RNK za fibrilin [30]. Takođe je pokazano da fibroblasti izolovani iz aktinčno oštećene kože prepisuju četiri puta više iRNK za elastin, u poređenju sa fibroblastima iz kože neizlagane Suncu. Uzrok je povećanje aktivnosti promotera gena za elastin [31]. Bernstein i sar. [32] su na modelu transgenih miševa, ispitivali uticaj UVA i UVB zraka na aktivnost humanog promotera gena za elastin. Zaključeno je da pojedinačne doze UVB i nešto manje UVA zraka povećavaju aktivnost promotera gena za elastin koja traje 72, odnosno 48 časova. Ponavljana izlaganja izazivaju kumulativni učinak. Dakle, višestruka izlaganja UV zračenju mogu da indukuju solarnu elastožu pri čemu ispoljavaju aditivan efekat. S obzirom na to da su UVB zraci delotvorni i *in vitro* uslovima, izvesno je da je njihov uticaj na dermalne fibroblaste posredan, za razliku od UVA zraka koji indukuju povećanje aktivnosti promotera elastinskog gena posredno, verovatno aktivacijom keratinocita, mastocita ili inflamacijskih ćelija. U prilog ovom zaključku govore nalazi Lavkera i sar. [25] da relativno male količine UVA zraka, za razliku od slične količine UVB zraka, prilikom ponavljane primene, izazivaju zapaljenske reakcije u koži. Savić i sar. najveći stepen patohistoloških promena registruju u grupi životinja (ženke BALBcAnNCR soja miševa), koje su izlagane UVA zračenju, bez fotoprotekcije. Navode da vidljive promene (zadebljala i grupisana elastična vlakna u gornjoj i središnjoj trećini dermisa) idu u prilog početnog stadijuma solarne elastože [33].

U brojnim istraživanjima, pokazano je da dermis fotoostarele kože sadrži veću količinu kiselih mukopolisaharida, smanjen nivo hidrokspirolina i prolina, povišenje matri-

ksnih metaloproteinaza, želatinaza, inhibitora proteaza i neutrofilnih elastaza; promene iRNK elastina, iRNK tropoelastina i iRNK fibrilina, a svi ti faktori mogu biti znak abnormalnog funkcionisanja fibroblasta. Sve ovo može voditi ka zaključku da elastični materijal proizvode fibroblasti koji su nepopravljivo povređeni dugogodišnjim delovanjem UV radijacije i da se može govoriti o sintezi aberantnih fibroblasta, a ne o degeneraciji elastičnih i kolagenih vlakana [17]. Rezultati našeg istraživanja sugerisu da je potrebno dalje ispitivanje i razjašnjenje fenomena degradacije i degeneracije elastičnih vlakana, kao i nastavak traganja za uzrokom koji dovodi do nagomilavanja elastičnog materijala u fotoostareloj koži.

Analizirajući uzorke fotoneksponirane kože grupe poznog i najstarijeg životnog doba zapazili smo, najpre diskretnu, fragmentaciju elastičnih vlakana u papilarnom dermu, koja progredira sa starenjem, dok su u retikularnom dermu vlakna normalne debljine, izukrštana u svim pravcima sa blago sniženim afinitetom za boje. Nismo uočili nakupine debelih, isprepletanih vlakana koje predstavljaju elastožni materijal. I drugi istraživači saopštavaju da sa starenjem u papilarnom dermisu dolazi do promena i iščezavanje elastičnih vlakana, koja su osetljivija na proces fibrilarnog lize u poređenju sa kolagenim vlaknima [34], s tim što se u retikularnom sloju povećava broj i širina vlakana, pa oni postaju grubi i fragmentovani. Progresivna degeneracija elastičnih vlakana javlja se pre svega kod hronološkog starenja kože [35]. Ovi rezultati su u skladu i sa studijom Uitto [36] koji je pokazao da tokom prirodnog starenja kože postoji jasna degeneracija mreže elastičnih vlakana. Slično zapažanje iznose Bonta i sar. [34], koji su u svojoj histološkoj studiji uzrasnih promena strukture elastičnih vlakana kože registrovali značajnije strukturne promene kod osoba starijih od 50 godina, a to je naša grupa poznog životnog doba u kojoj su takođe evidentirane značajne promene.

Rezultate slične našim nedavno su publikovali autori koji su bojili i analizirali kožu leđa, kao fotoneksponiranu regiju, dve starosne grupe. Bojenjem na Orcein identifikovane su promene elastičnih vlakana tokom starenja. Tanke, kratke i fragmentovane snopove imalo je 63.6% starih. Umereno zadebljala vlakna su uočena kod 18.2% starih, a bogata elastična vlakna u papilarnom i retikularnom dermisu nađena su u 18.2% starih ispitanika. Na drugoj strani kod mlade grupe se vidi bogata mreža elastičnih vlakana u 87.7%, a umereno zadebljala vlakna u 13.3%. Tanki, kratki, nejasni i fragmentovani snopovi elastičnih vlakana nisu pronađeni ni kod jednog od mladih ispitanika [37]. Nešto ranije, slično zapažanje izneli su autori druge studije, naglasivši da u fotoneksponiranoj koži poprečni sloj elastičnih vlakana sa godinama postaje tanji, uz značajno smanjenje količine elastina [18].

Nisu svi autori saglasni sa stavom da tokom hronostarenja dolazi do progresivnog gubitka i degeneracije elastičnih vlakana. Odsustvo korelacije se može pripisati većem broju faktora: hormonalnom, genetskom, nutrijcijskom, itd. koji takođe mogu uticati na brzinu starenja kože pojedina [38].

## ZAKLJUČAK

U našem istraživanju ustanovili smo da se korelacija organizacije i zastupljenosti elastičnih vlakana sa uzrastom razlikuje se na fotoneksponiranoj i fotoneksponiranoj koži. Na osnovu opšte organizacije, orijentacije i debljine

elastične mreže u dermu može se zaključiti da se na fotoekspoziranoj koži osoba starije životne dobi javljaju akumulacije elastotičnog materijala praćene degeneracijom okolne kolagene mreže, dok je na fotoneekspoziranoj koži tokom starenja elastična mreža redukovana sa kratkim, tankim, neorganizovanim i često fragmentisanim vlaknima koja su manje prijemčiva za boje. Najvažnija karakteristika fotostarenja je solarna elastoza, koja počinje na spoju papilarnog i retikularnog derma i koja se histološki karakteriše nakupinama upletenih i degenerisanih elastičnih vlakana koja progrediraju u amorfnu masu. Kvantitativna

evaluacija volumenske gustine elastičnih vlakana može biti u korelaciji sa klinički iskazanim znacima fotostarenja, pre svega solarne elastoze.

Na fotoekspoziranoj koži količina elastičnih vlakana, izmenjena i u formi elastotičnog materijala, se progresivno povećava sa starenjem od pete dekade, a na fotoneekspoziranoj koži količina elastičnih vlakana, nakon treće dekade, progresivno opada sa starenjem.

**NAPOMENA:** Sprovedeno istraživanje predstavlja jedan segment doktorske disertacije prvog autora.

## LITERATURA

1. DeClerck, YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA. et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(4):1131-9.
2. Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković i et al. *Histologija*, Impresum, Niš, 2009.
3. Midwood KS, Schwarzbauer JE. Elastic fibers: building bridges between cells and their matrix. *Curr Biol.* 2002; 12(8): R279-R281.
4. Kielty CM, Shuttleworth CA. Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech.* 1997; 38(4): 413-27.
5. Bumbaširević V. Građa i razvoj kože. In: Karadaglić Đ, ed. *Dermatologija*, Vojnoizdavački zavod, Beograd, 2000; 65-86.
6. Plopper G. The extracellular matrix and cell adhesion, in *Cells* (eds Lewin B, Cassimeris L, Lingappa V, Plopper G). Sudbury, MA: Jones and Bartlett, 2007.
7. Egles C, Huet HA, et al. Integrin-blocking antibodies delay keratinocyte reepithelialization in a human three-dimensional wound healing model. *PLoS One* 2010; 5(5): e10528.
8. McGrath JA, Uitto J. Anatomy and organization of human skin. V: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (Eds.), *Rook's textbook of dermatology*, Eighth Edition, Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, USA, Chapter 3, 2010.
9. Wondrak, GT, Roberts MJ, Cervantes-Laurean D, et al. Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 121(3):578-86.
10. Philips N, Keller T, Hendrix C, Hamilton S, et al. Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 2007; 299(8):373-9.
11. Knott A, Reuschlein K, Lucius R, Stab F, Wenck H, Gallinat S. Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis. *Biogerontology.* 2009; 10 (2):181-90.
12. Muto J, Kuroda K, et al.. Accumulation of elafin in actinic elastosis of sundamaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol.* 2007; 127 (6): 1358-66.
13. Tasić V. Osnovne histoheimijske metode u patohistologiji. Lela, Beograd, 1994.
14. McManus JF and Mowry RW. *Staining methods histological and histochemical.* Paul Hoeber Inc. New York, 1960.
15. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 2002; 138: 1462-70.
16. Martin Dunitz; Gilchrist BA. A review of skin aging and its medical therapy. *Br J Dermatol.* 1996; 135(6):867-75.
17. Sellheyer K. Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cutan Pathol* 2003; 30:123-127.
18. El-Domyati S, Attia F, Saleh D, Brown DE, Birk F, Gasparro H, Ahmad J, Uitto. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology.* 2002; 11(5): 398-405.
19. Bernstein EF, Brown DB, Chen YQ, Fisher L, Hahn PJ, Kopp JB, Lakkakorpi J, Robey FA, Uitto J. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 34 (2 Pt 1):209-18.
20. West MD. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol.* 1994; 130:87-95.
21. Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol.* 1986; 15: 571-585.
22. Chung JH, Seo JY, Lee MK, Eun HC, Lee JH, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Ultraviolet modulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2002; 119 (2): 507-12.
23. Kligman AM. Early destructive effects of sunlight on human skin. *J Am Med Assoc.* 1969; 210:2377-80.
24. Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G. Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006; 20 (8):980-7.
25. Matsuoka LY, Uitto J. Alterations in the elastic fibers in cutaneous aging and solar. elastosis. In: Balin AK, Kligman Am, eds. *J Am Acad Dermatol.* 1989; 21:638-644.
26. Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, Irwin CJ, Kaidbey KH. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1995; 32(1):53-62.
27. Ma W, Wlaschek M, Tancheva-Poor I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the connective tissue. *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26(7): 592-99.

- 
28. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol.* 2007; 157(5): 874-87.
  29. Bernstein EF, Uitto J. The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clinics in dermatology.* 1996; 14(2): 143-51.
  30. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, and Burgdorf W. *Dermatology.* New York: Springer, 2000.
  31. Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol.* 1994; 103(2):182-6.
  32. Bernstein EF et al. Evaluation of sunscreens with various sun protection factors in a new transgenic mouse model of cutaneous photoaging that measures elastin promoter activation. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 37: 725- 729.
  33. Savić S, Mijović M, Ilić A, Mandić P, Đerković B. Ultravioletno A zračenje i fotostarenje kože miševa. *Praxis medica.* 2017; 46 (1-2) 1-7.
  34. Bonta M, Daina L, Muțiu G. The process of ageing reflected by histological changes in the skin. *Rom J Morphol Embryol.* 2013; 54(3 Suppl):797-804.
  35. Lavker RM, Zheng PS, and Dong G. Morphology of aged skin. *Clin Geriatr Med.* 1989; 5: 53-67.
  36. Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drug Dermatol.* 2008; 7:12-6.
  37. Abd El-Aal NH, Abd El-Wadood FA, Moftah NH, El-Hakeem MS, El-Shaal AY, Hassan NB. Morphometry and epidermal fas expression of unexposed aged versus young skin. *Indian J Dermatol.* 2012; 57(3):181-186.
  38. Farage AM, Miller W, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: A review. *Int J Cosmet Sci.* 2008; 30:87-95.