

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Tamara I. Martinović

**Ultrastrukturne promene u limfocitima
periferne krvi bolesnika sa
Diabetes mellitus-om tip 2**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Tamara I. Martinović

**Ultrastructural alterations in peripheral
blood lymphocytes in
type 2 diabetes patients**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

MENTOR:

Prof. dr Tamara Kravić-Stevović

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

Prof. dr Katarina Lalić

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Akademik Vladimir Bumbaširević

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Vladimir Trajković

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Miljan Krstić

Docent Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Nišu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Svojoj mentorki prof. dr Tamari Kravić-Stevović na ukazanom poverenju, velikoj podršci i pomoći u svim fazama izrade disertacije

Svojoj komentorki, prof. dr Katarini Lalić na velikoj pomoći prilikom odabira pacijenata, prikupljanja uzoraka i pomoći tokom izrade disertacije

Akademiku Vladimiru Bumbašireviću na podršci i pomoći pri pisanju teze

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću na pomoći u dizajnu eksperimenata i pri pisanju teze

Doc. dr Miljanu Kostiću na korisnim savetima pri pisanju disertacije

Darku Ćiriću na dugogodišnjoj prijateljskoj saradnji, pomoći u eksperimentalnom radu i iskrenoj podršci pri pisanju disertacije

Ljubici Vučićević i Maji Misirkić Marjanović na pomoći u eksperimentalnom radu i korisnim savetima pri pisanju disertacije

Doktorki Ivi Rasulić i sestrama iz Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije na velikoj pomoći prilikom prikupljanja podataka o pacijentima i uzimanja uzoraka krvi

Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju Instituta za histologiju i embriologiju za pomoć prilikom obrade i slikanja uzoraka

Svim kolegicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove disertacije

Mojim roditeljima i supругu koji su mi pružili bezgraničnu podršku i razumevanje prilikom izrade disertacije

Ultrastrukturne promene u limfocitima periferne krvi bolesnika sa *Diabetes mellitus*-om tip 2

REZIME

Uvod: Tip 2 dijabetes melitus (T2DM), trenutno jedna od najvećih globalnih epidemija, predstavlja heterogenu grupu poremećaja koja se karakteriše različitim nivoom insulinske rezistencije, poremećenom sekrecijom insulina i hiperglikemijom. Kao početna terapija T2DM koristi se metformin, dok se u kasnijem toku bolesti u terapiji koristi insulin. Nedavni nalazi autoantitela na β ćelije pankreasa i autoreaktivnih T limfocita u T2DM dovode do pretpostavke da u patogenezi T2DM postoji autoimunska komponenta. Savremena istraživanja ukazuju na značaj autofagije u patogenezi T2DM, ali je njena uloga kontroverzna. Rezultati nekih studija ukazuju na povećanu aktivnost autofagije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, dok su u drugim studijama detektovali njenu sniženu aktivnost u ovim ćelijama u dijabetesu. Autofagija je lizosomalni put degradacije intracelularnih komponenti u fiziološkim uslovima i u ćelijskom stresu, i ima ključnu ulogu intracelularnom metabolizmu. Promene u autofagičnom procesu mogu nastati kao odgovor na hiperglikemiju kod bolesnika sa T2DM. Novija elektronsko mikroskopska istraživanja su pokazala da u T2DM dolazi do morfoloških promena u izgledu nukleusa u vidu nepravilnosti oblika i binukelacije nukleusa. Pretpostavka je da su nepravilnosti oblika nukleusa u normalnim humanim limfocitima rezultat aktivacije T limfocita.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je da se metodama ultrastrukturne morfometrije kvantifikuje broj autofagičnih struktura u limfocitima periferne krvi T2DM bolesnika na elektronskom mikroskopu; da se koreliraju dobijeni rezultati sa ekspresijom proteina uključenih u proces autofagije; da se uradi ultrastrukturna analiza aktivacije limfocita i oštećenja subcelularnih struktura kod bolesnika sa T2DM; fraktalna analiza ultrastrukturnog izgleda nukleusa i citoplazme limfocita sa T2DM; i korelacija statusa autofagije sa aktivacijom i oštećenjem subcelularnih struktura u limfocitima bolesnika sa T2DM, kao i sa rezultatima dobijenim fraktalnom analizom nukleusa i citoplazme.

Materijal i metode: Mononuklearne ćelije su izolovane iz periferne krvi novootkrivenih T2DM bolesnika, T2DM bolesnika lečenih metforminom, T2DM bolesnika lečenih insulinom i zdravih ispitanika primenom koncentracionog gradijenta. Za ultrastrukturnu analizu i kvantifikaciju autofagičnih struktura ćelije su ukalupljene u epoksidne smole, kontrastirane uranil-acetatom i olovo-citratom i analizirane na transmisionom elektronskom mikroskopu. Na dobijenim slikama kvantifikovan je broj autofagičnih struktura, mitohondrija, lipidnih kapi i subnuklearnih struktura. Primenom dvostruke „coherent point“ mrežice određivan je volumen autofagičnih struktura, a primenom *ImageJ* programa analizirani su oblik i procenat heterohromatina nukleusa limfocita. Primenom *ImageJ* programa urađene su fraktalna i teksturalna analiza nukleusa i citoplazme limfocita. Kvantifikacija mitofagije, autofagičnih struktura i lizozoma urađena je na konfokalnom mikroskopu primenom dvostrukog bojenja anti-LC3B antitela i MitoTracker-a, odnosno LysoTracker-a. Primenom protočne citometrije mereno je prisustvo kiselih vezikula obojenih akridin oranžom. Imunoblotom je kvantifikovana ekspresija proteina uključenih u proces autofagije: LC3, Beclin 1, ATG5 i p62. Ekspresija gena autofagičnog procesa je utvrđena primenom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja cDNK dobijene reverznom transkripcijom.

Rezultati: Na elektronskom mikroskopu limfociti zdravih osoba su imali okrugle, predominantno heterohromatične nukleuse i malu količinu citoplazme sa retko prisutnim organelama. Nasuprot tome, limfociti T2DM bolesnika imali su euhromatične nukleuse nepravilnog oblika sa dubokim usecima i veći broj organela prisutnih u citoplazmi. Analiza morfoloških karakteristika nukleusa pokazala je da T2DM bolesnici imaju nukleuse smanjene cirkularnosti, oblosti i solidnosti i veći broj subnuklearnih struktura u odnosu na zdrave osobe. Analiza procenta heterohromatina je pokazala da su nukleusi T2DM bolesnika euhromatičniji, tj. transkripciono aktivniji, na šta ukazuje i povećanje broja subnuklearnih struktura. Fraktalna i teksturalna analiza su pokazale smanjenje kompleksnosti i homogenosti nukleusa uz povećanje strukturnih praznina kod T2DM bolesnika, ukazujući na izmenjenu morfologiju nukleusa. Nivo glukoze našte i HbA_{1c} korelira sa fraktalnom dimenzijom nukleusa i citoplazme, kao i sa parametrima oblika nukleusa pokazujući da hiperglikemija indukuje morfološke promene u nukleusu. Postoji korelacija između nivoa triglicerida u krvi i fraktalne dimenzije nukleusa, što nagoveštava da nivo triglicerida utiče na kompleksnost hromatinskih struktura u nukleusu. Prosečna

veličina limfocita i volumenski udeo citoplazme u ćeliji se nisu razlikovali između ispitivanih grupa, a fraktalna analiza citoplazme je pokazala da kod T2DM bolesnika postoji smanjenje kompleksnosti struktura i povećanje strukturnih praznina unutar citoplazme, ukazujući na veći broj vezikula u citoplazmi. U limfocitima T2DM bolesnika uočeno je više autofagičnih struktura većeg volumena, ukazujući na povećanje procesa autofagije. Broj mitohondrija kod T2DM bolesnika bio je veći u odnosu na zdrave ispitanike, što može biti posledica izmenjenog metaboličkog statusa ovih ćelija u T2DM. Analiza autofagičnih struktura na konfokalnom mikroskopu pokazala je kod T2DM bolesnika veći broj autofagičnih struktura obojenih LC3B antitelom i mitofaga, kao kolokalizovanih punkta LC3B i MitoTracker-a. Bojenje ćelija LysoTracker-om pokazalo je smanjenje broja lizozoma kod T2DM bolesnika, uz povećanje broja autofagičnih struktura, što govori u prilog lizozomalne deficijencije u dijabetesu. Postoji korelacija između nivoa glukoze i HbA_{1c} i broja autofagičnih struktura i mitofaga, ukazujući da nivo glukoze u krvi ima direktan uticaj na autofagiju u limfocitima periferne krvi. Broj autofagičnih struktura korelira sa morfološkim promenama oblika nukleusa. Nivo ukupnog holesterola i nivo LDL-a u krvi koreliraju sa površinom autofagičnih struktura i sa ekspresijom Vps34 gena, dok nivo HDL-a korelira sa ekspresijom ATG4b, BECN, FOXO1 i FOXO3. Protočna citofluorimetrija je pokazala da ne postoji povećanje broja kiselih vezikula kod T2DM, što uz, bojenje LysoTracker-om, ukazuje na problem u kiselosti lizozoma. Imunoblot analiza je pokazala da ne postoji povećanje ekspresije proteina LC3B, p62, ATG5 i beklina, najverovatnije zbog malog broja ispitanika u grupi i njihove varijabilnosti. Analiza ekspresije gena pokazala je povećanje ekspresije ATG4b gena kod T2DM bolesnika. Postoji korelacija između broja i volumena različitih autofagičnih struktura i ispitivanih gena uključenih u proces autofagije, dok ekspresija proteina ATG5 i p62 korelira sa morfološkim promenama u nukleusu.

Zaključak: Veći broj autofagičnih struktura u limfocitima periferne krvi bolesnika sa T2DM, detektovan mikroskopskim metodama u našoj studiji, verovatno je posledica disfunkcije lizozoma u ovim ćelijama. Limfociti periferne krvi kod bolesnika sa T2DM razlikuju se od istih ćelija zdravih osoba po izgledu nukleusa. Nukleusi limfocita bolesnika sa T2DM su nepravilnog oblika i sa većom količinom euhromatina, a promena njihovog izgleda je u vezi sa nivoom glikemije T2DM bolesnika. Morfološki izgled nukleusa limfocita T2DM bolesnika takođe je i u vezi sa prisustvom autofagičnih

struktura u ovim ćelijama. Elektronska mikroskopija se u našem istraživanju pokazala senzitivnijom metodom za detekciju autofagije u odnosu na molekularne metode.

Ključne reči: dijabetes, limfociti, autofagija, nukleus, elektronska mikroskopija, fraktalna analiza, glukoza

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

Ultrastructural alterations in peripheral blood lymphocytes in type 2 diabetes patients

ABSTRACT

Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM), currently one of the largest global epidemics, is a heterogeneous group of disorders characterized by varying levels of insulin resistance, impaired insulin secretion, and hyperglycemia. Initial therapy for T2DM is metformin, but with the progression of disease, insulin therapy is used. Recent findings of autoantibodies against pancreatic β -cell and autoreactive T cell in T2DM lead to the assumption that there is an autoimmune component in the pathogenesis of T2DM. Recent researches point out the importance of autophagy in the pathogenesis of T2DM, but its role is controversial. Some studies indicate an increased autophagy level in peripheral blood mononuclear cells, while others showed decreased level of autophagy in these cells in diabetes. Autophagy is a lysosomal pathway of degradation of intracellular components in physiological conditions and in cellular stress, and plays a key role in intracellular metabolism. Changes in the autophagy may arise in response to hyperglycemia in patients with T2DM. Recent electron microscopy studies have shown that cells in T2DM have morphological changes in the appearance of the nuclei in the form of shape irregularities and binucleation. It has been proposed that nuclear contour irregularity in normal human lymphocytes, could result from T cell activation.

Aim: The aim of this study was to quantify the number of autophagic structures in the peripheral blood lymphocytes of the T2DM patients on an electron microscope, using the methods of ultrastructural morphometry; and to correlate the results obtained with the expression of proteins involved in the autophagy; to perform ultrastructural analysis of lymphocyte activation and subcellular structure damage in T2DM patients; fractal analysis of the ultrastructural appearance of T2DM lymphocyte nuclei and cytoplasm; to correlate autophagy level with activation and damage of subcellular structures in the lymphocytes of T2DM patients, as well as with the results obtained from the fractal analysis of the nuclei and cytoplasm.

Material and methods: Mononuclear cells were isolated from the peripheral blood of newly diagnosed T2DM patients, T2DM patients treated with metformin, T2DM patients treated with insulin and healthy individuals using a density gradient centrifugation. For ultrastructural analysis and quantification of autophagic cell structures, cells were embedded in Epoxy resins, stained with uranyl acetate and lead citrate, and analyzed on a transmission electron microscope. The obtained images were used for quantification of the number of autophagic structures, mitochondria, lipid droplets and subnuclear structures. Using the "coherent point" grid, the fractional volume of autophagic structures was determined, and the heterochromatin/euchromatin ratio of the lymphocyte nuclei was analyzed using ImageJ. Fractal and textural analysis of the lymphocyte nuclei and cytoplasm were performed in ImageJ. The quantification of mitophagy, autophagic structures, and lysosomes was performed on a confocal microscope using the double staining with anti-LC3B antibody and MitoTracker or LysoTracker. Flow cytometry was used to measure the presence of acidic vesicles stained with acridine orange. Immunoblotting was used for the evaluation of the expression of proteins that are involved in the autophagy: LC3, Beclin 1, ATG5 and p62. A reverse transcription polymerase chain reaction was used to determine the expression of genes involved in autophagy.

Results: Healthy lymphocytes had round, predominantly heterochromatic nuclei, and a small amount of cytoplasm with rare organelles on the electron microscope. In the contrast, the T2DM patients' lymphocytes had euchromatic nuclei with irregular contours and deep indentations and cytoplasm with a larger number of organelles. Analysis of the morphological characteristics of the nuclei has shown that T2DM patients' lymphocytes have nuclei with reduced circularity, roundness and solidity, and greater number of subnuclear structures than healthy individuals. The higher ratio of euchromatin vs. heterochromatin in lymphocyte nuclei in type 2 diabetes that we have found and higher number of subnuclear structures in these cells, indicate increased transcriptional activity of these cells. Fractal and textural analysis showed a reduction in the complexity and homogeneity of the nuclei with an increase in structural gaps in T2DM patients, indicating an altered morphology of the nuclei. Glucose and HbA_{1c} levels correlate with the fractal dimension of the nucleus and cytoplasm, as well as the parameters of the nucleus shape, indicating that hyperglycemia induces morphological changes in the nucleus. Blood

triglyceride level correlated with the fractal dimension of the nucleus, which suggests that triglyceride levels affect the complexity of chromatin structures in the nucleus. The average size of the lymphocytes and the volume fraction of the cytoplasm in the cell, did not differ between the examined groups. Fractal analysis of the cytoplasm showed decrease in the complexity of structures and an increase in the structural gaps within the cytoplasm in the T2DM patients, which is consistent with a greater number of vesicles in the cytoplasm of T2DM patients. Morphometric analysis showed higher number and volume of autophagic structures in T2DM lymphocytes. Number of mitochondria was also higher in T2DM patients' lymphocytes than in healthy individuals, presumably due to changed metabolic status of these cells in T2DM. Analysis of autophagic structures on the confocal microscope revealed higher number of autophagic structures stained with LC3B antibody, as well as higher number of autophagic structures containing mitochondria, seen as co-localized LC3B and MitoTracker puncta in T2DM patients. Analysis of cells stained with LysoTracker showed a decrease in the number of lysosomes in T2DM patients, with an increase in the number of autophagic structures, which suggests lysosomal deficiency in T2DM. Positive correlation of glucose and HbA_{1c} levels with the number of autophagic structures and mitophagy, indicates that blood glucose level has direct effect on autophagy in peripheral blood lymphocytes. The number of autophagic structures correlates with morphological changes in the shape of the nucleus. The blood levels of total cholesterol and LDL correlate with the fractional volume of autophagic structures and with the expression of Vps34 gene, while HDL level correlate with the expression of ATG4b, BECN, FOXO1 and FOXO3. Flow cytometry has shown no increase in the number of acidic vesicles in T2DM, which, together with LysoTracker staining, indicates a problem in the acidity of lysosomes. Immunoblot analysis has shown no increase in the expression of LC3B, p62, ATG5, and Beclin proteins, most likely due to the small number of subjects in the group and their variability. Analysis of gene expression showed an increase in the expression of ATG4b gene in T2DM patients. There is a correlation between the number and volume of various autophagic structures and examined genes involved in the autophagy process, while the expression of ATG5 and p62 protein correlates with the morphological changes in the nucleus.

Conclusion: Higher number of autophagic structures in the peripheral blood lymphocytes in T2DM patients detected by microscopic methods in our study is probably

due to lysosomal dysfunction in these cells. Peripheral blood lymphocytes of T2DM patients differ from the same cells of healthy individuals in the appearance of the nucleus. Lymphocyte nuclei of T2DM patients have irregular nuclear contour and a higher amount of euchromatin, and the change in their appearance is related to the level of glycaemia in T2DM patients. The morphological appearance of the lymphocyte nuclei in T2DM patients is also related to the presence of autophagic structures in these cells. In our research, electron microscopy proved itself as more sensitive method for detection of autophagy compared to molecular methods.

Keywords: diabetes, lymphocyte, autophagy, nucleus, electron microscopy, fractal analysis, glucose

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Tip 2 Diabetes Mellitus.....	1
1.2 Autofagija.....	4
1.3 Limfociti.....	9
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJAL I METODE.....	13
3.1 Odabir ispitanika.....	13
3.2 Biohemijske analize krvi.....	14
3.3 Izolacija mononuklearnih ćelija.....	14
3.4 Priprema uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju	15
3.4.1 Priprema uzorka i kalupljenje.....	15
3.4.2 Sečenje uzoraka na ultramikrotomu	16
3.4.3 Kontrastiranje mrežica.....	16
3.5 Morfometrijske analize na transmisionom elektronskom mikroskopu.....	17
3.6 Analiza oblika nukleusa	18
3.7 Analiza površine heterohromatina.....	20
3.8 Fraktalna analiza nukleusa i citoplazme	21
3.9 Teksturalna analiza nukleusa i citoplazme.....	22
3.10 Procena autofagije na konfokalnom mikroskopu	23
3.11 Kvantifikacija kiselih vezikula primenom protočne citofluorimetrije.....	25
3.12 Imunoblot analiza	25
3.13 Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije.....	28
3.13.1 Izolacija RNK.....	28
3.13.2 Reverzna transkripcija	29

3.13.3	qRT-PCR.....	29
3.14	Statistička analiza	30
4.	REZULTATI	31
4.1	Karakteristike ispitanika.....	31
4.2	Morfometrijske analize na transmisionom elektronskom mikroskopu.....	33
4.3	Analiza oblika i morfoloških karakteristika nukleusa	39
4.4	Analiza površine heterohromatina.....	46
4.5	Fraktalna analiza nukleusa i citoplazme	47
4.5.1	Fraktalna analiza nukleusa	47
4.5.2	Fraktalna analiza citoplazme.....	49
4.6	Teksturalna analiza nukleusa i citoplazme.....	50
4.6.1	Teksturalna analiza nukleusa.....	50
4.6.2	Teksturalna analiza citoplazme	53
4.7	Procena autofagije na konfokalnom mikroskopu	53
4.8	Kvantifikacija kiselih vezikula primenom protočne citofluorimetrije.....	56
4.9	Imunoblot analiza	57
4.10	Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije.....	57
4.11	Korelacija morfometrijske analize autofagičnih struktura i parametara oblika nukleusa	59
4.12	Korelacija morfometrijske analize autofagičnih struktura i fraktalne analize ..	60
4.13	Korelacija ultrastrukturne analize i ekspresije proteina uključenih u proces autofagije	61
4.14	Korelacija ultrastrukturne analize i ekspresije gena uključenih u proces autofagije	62
4.15	Korelacija broja mitohondrija sa parametrima oblika nukleusa.....	63
4.16	Korelacija nivoa glukoze sa morfološkim parametrima	64
4.17	Korelacija vrednosti HbA _{1c} sa morfološkim parametrima.....	65

4.18	Korelacija lipidnih parametara sa morfološkim parametrima.....	65
5.	DISKUSIJA.....	67
6.	ZAKLJUČCI	77
7.	LITERATURA.....	78

1. UVOD

1.1 *Tip 2 Diabetes Mellitus*

Jednu od najvećih epidemija sa kojom se svet suočava, kako u razvijenim zemljama tako i u zemljama u razvoju, predstavlja dijabetes melitus.¹ Broj obolelih se više nego udvostručio u poslednjih 20 godina, a očekuje se da će do 2040. godine 10,4% populacije (642 miliona) u svetu bolovati od dijabetesa.² Više od 90% obolelih od dijabetesa ima tip 2, a najveći broj obolelih je između 40 i 60 godina starosti.³ Činjenica koja zabrinjava je porast broja obolelih među decom, adolescentima i mladim odraslim osobama.⁴ Za razliku od tip 1 dijabetesa melitusa, početak tip 2 dijabetesa često prolazi neprimećeno, pa su incidenca i prevalenca bolesti manje nego što realno ima obolelih.⁵ Dijabetes je četvrti vodeći uzrok smrti u Srbiji i Evropi.³

Dijabetes melitus je metabolički poremećaj koga karakteriše hiperglikemija praćena poremećajem metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina usled parcijalne ili kompletne insulinske deficijencije.^{5,6,7} Danas se koristi etiološka klasifikacija dijabetesa: na tip 1 dijabetes (raniji naziv insulin zavisni dijabetes), koga karakteriše autoimunska destrukcija β ćelija pankreasa; tip 2 dijabetes (raniji naziv insulin nezavisni dijabetes), koji se karakteriše insulinskom rezistencijom; drugi specifični oblici dijabetesa i gestacijski dijabetes.^{3,8}

Tip 2 dijabetes melitus (T2DM) čini heterogena grupa poremećaja koja se karakteriše različitim nivoom insulinske rezistencije, poremećenom sekrecijom insulina, povećanom produkcijom glukoze u jetri i poremećenim metabolizmom masti, u kojoj genetski i metabolički defekti u sekreciji i/ili delovanju insulina daju klasičan fenotip hiperglikemije.⁹ U ranim fazama bolesti, usprkos pojavi insulinske rezistencije, tolerancija glukoze je skoro normalna, zbog kompenzatornog povećanja sekrecije insulina pankreasnih β ćelija.^{8,9,10} Progresija insulinske rezistencije zajedno sa kompenzatornom hiperinsulinemijom dovodi do poremećaja u Langerhansovim ostrvcima koja više ne mogu da kompenzuju nedostatak insulina i razvija se netolerancija na glukozu, karakterisana povećanim nivoima glukoze postprandijalno.^{8,9,10} Dalji pad

insulinske sekrecije i porast produkcije glukoze u jetri dovodi do potpunog razvoja dijabetesa koji se karakteriše hiperglikemijom našte.^{8,9,10} Najveći deo bolesnika sa T2DM je gojazan.^{8,9,10} U T2DM postoji nasledna komponenta, bolest je poligena i multifaktorijalna, a faktori kao što su gojaznost, način ishrane i fizička aktivnost modulišu fenotip.⁸ Osobe kojima jedan od roditelja ima T2DM imaju povišen rizik za razvoj bolesti, dok osobe kod kojih su oba roditelja sa T2DM imaju 40% šansi da obole od ove bolesti.⁸

Dijagnoza T2DM se postavlja po kriterijumima Američke asocijacije za dijabetes (ADA), Evropske asocijacije za istraživanje dijabetesa i Internacionalne federacije za dijabetes koji su u primeni i u našoj zemlji. Kriterijumi za postavljenje dijagnoze su različiti i uključuju visoke nivoe glukoze našte, visoke vrednosti glikemije detektovane kao odgovor na oralni test tolerancije glukoze (OGTT), visoke nivoe glikoziliranog hemoglobina (HbA_{1c}) ili pojavu dijabetes-specifičnih komplikacija uz vrlo visoke povremene vrednosti glikemije.⁸

Kako bi se postavila dijagnoza T2DM kod bolesnika treba detektovati jedan od navedenih kriterijuma:^{2,3,11}

- Simptomi dijabetesa sa povremenim nivoima glukoze $\geq 11,1$ mmol/L,
- Glukoza našte ≥ 7 mmol/L,
- Hemoglobin A_{1c} $\geq 6,5\%$,
- Vrednosti plazma glukoze $\geq 11,1$ mmol/L na drugom satu OGTT.

Trenutni kriterijumi za dijagnozu dijabetesa ističu HbA_{1c} i glukozu našte kao najpouzdanije i najzgodnije testove za otkrivanje dijabetesa kod asimptomatskih bolesnika. Nivo HbA_{1c} je pokazatelj prosečne glikemije tokom poslednja dva do tri meseca.¹² OGTT je i još uvek validan test za dijagnozu dijabetesa, ali se ne koristi često u rutinskoj dijagnostici.⁸ Preporuke ADA su da se kod osoba starijih od 45 godina radi skrining na ovu bolest na svake 3 godine, a da se kod gojaznih osoba skrining radi i u ranijem dobu (pre 45 godine života).¹¹

Faktori rizika za razvoj T2DM su: pozitivna familijarna istorija bolesti; gojaznost (indeks telesne mase ≥ 25 kg/m²); fizička neaktivnost; ranije identifikovana netolerancija na glukozu ili nivo HbA_{1c} između 5,7-6,4%; gestacijski dijabetes u anamnezi ili težina

bebe na porođaju preko 4 kg; hipertenzija (krvni pritisak \geq 140/90 mmHg); nivo HDL holesterola $<$ 0,9 mmol/L i/ili nivo triglicerida $>$ 2,82 mmol/L; sindrom policističnih jajnika ili *acanthosis nigricans*.¹¹

Komplikacije T2DM se mogu ispoljiti u bilo kom organskom sistemu i odgovorne su za morbiditet i mortalitet ove bolesti.⁸ One se najčešće ne pojavljuju pre druge dekade hiperglikemije, ali pošto T2DM ima dugačak asimptomatski period hiperglikemije pre dijagnoze bolesti, mnogi bolesnici već imaju komplikacije u vreme postavljanja dijagnoze.⁸ Najveći broj komplikacija se može prevenirati ili odložiti ranom dijagnostikom, agresivnom glikemijskom kontrolom i smanjenjem faktora rizika.⁸ Komplikacije T2DM se dele na vaskularne i nevaskularne. Vaskularne komplikacije mogu biti mikrovaskularne (retinopatija, neuropatija, nefropatija), koje su dijabetes specifične, i makrovaskularne (koronarna bolest srca, periferne angiopatije, cerebrovaskularne bolesti), koje se javljaju i kod osoba koje nemaju dijabetes ali ređe.⁸ Nevaskularne komplikacije T2DM su gastropareza, infekcije, promene na koži i gubitak sluha.⁸

Terapija T2DM se započinje promenom ishrane, kontrolom telesne mase i povećanjem fizičke aktivnosti. Lek izbora za započinjanje medikamentne terapije T2DM je metformin.³ U terapiji T2DM, ukoliko je na samom početku bolesti nivo HbA_{1c} visok, lečenje se započinje kombinacijom oralnih antidijabetika.³ Uz metformin, oralni antidijabetici koji se koriste u lečenju T2DM su sulfonilureja, tiazolidindioni, DPP-4 inhibitori, GLP-1 receptor agonisti.¹³ Oralni antidijabetici se mogu koristiti u vidu kombinacije dva ili tri leka istovremeno, sa ili bez insulina.¹³ Uvođenje kombinacije dva ili tri leka se vrši ukoliko se ne postigne određena vrednost HbA_{1c} u periodu od 3 do 6 meseci.³ Insulinska terapija se uvodi na početku bolesti ukoliko su vrednosti glikemije $>$ 16 mmol/l, odnosno HbA_{1c} $>$ 10,0%, i može biti privremena.³

Biguanidin metformin (N",N"-dimethylbiguanidin), koji se koristi se za smanjenje nivoa glukoze u krvi,¹⁴ početna je terapija T2DM.³ Mehanizmi delovanja metformina su raznoliki.¹⁵ Metformin aktivira 5' adenzin monofosfatom aktiviranu protein kinazu (AMPK) preko inhibicije kompleksa I mitohondrijalnog respiratornog lanca.¹⁶ S druge strane, mnogi efekti metformina na ćelijski metabolizam nisu posredovani putem AMPK, kao što je kontrola glavnih metaboličkih puteva u T limfocitima i, posledično, kontrola

njihovog rasta i proliferacije.^{17,18,19} Insulin, kao terapija, je neophodan velikom broju pacijenata sa T2DM u cilju postizanja terapijskih ciljeva i veoma efikasno omogućava njihovo rano postizanje i održavanje.³ Kao glavni regulator nivoa glukoze u krvi, insulin reguliše preuzimanje glukoze u mišićima i masnom tkivu, glukoneogenezu u jetri i olakšava akumulaciju glikogena i lipida u mišićima, jetri i masnom tkivu promovišući lipogenezu, sintezu proteina i glikogena.²⁰ Postprandijalni porast nivoa insulina i glukoze u krvi aktivira mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) u metaboličkim tkivima,²⁰ dovodeći do inhibicije autofagije u ovim ćelijama.²¹

Danas se smatra da je aktivacija autoimunskog odgovora jedna od komponenti patogeneze tip 1 dijabetes melitusa,²² a nalazi cirkulišućih autoantitela na β ćelije pankreasa u T2DM,²³ kao i autoreaktivnih T limfocita,²² dovode do pretpostavke da i u patogenezi T2DM postoji autoimunska komponenta.

1.2 Autofagija

Autofagija je skup procesa kojima se intracelularni materijal razgrađuje unutar lizozoma i putem koga se makromolekulske komponente recikliraju.²⁴ Značajnu ulogu u patogenezi T2DM ima proces autofagije.²⁵ Predispozicija organizma za razvoj metaboličkog sindroma i dijabetesa može nastati usled deficijencije u procesu autofagije budući da autofagija ima ključnu ulogu u funkcionisanju organela, intracelularnom metabolizmu i sistemskoj metaboličkoj homeostazi.²⁶ Progresija intolerancije na glukozu i promene u procesu autofagije u β ćelijama pankreasa su pokazane kod bolesnika sa dijabetesom i u različitim animalnim modelima dijabetesa.²⁷ Savremena istraživanja ukazuju na značaj autofagije i njenu povezanost sa nastankom apoptoze i smanjenjem mase β ćelija pankreasa.⁶ Dok proces autofagije ima značajnu ulogu u očuvanju strukture i funkcije β ćelija pankreasa u početku razvoja T2DM, hronična aktivacija ovog procesa dovodi do oštećenja i autofagične ćelijske smrti u pankreasu u kasnijem toku bolesti.²⁸ Autofagija, pored uloge koju ima u preživljavanju β ćelija pankreasa ima ulogu i u regulaciji insulinske homeostaze.⁶ U različitim studijama u kojima je ispitivan efekat rapamicina, induktora autofagije,²⁹ na β ćelije pankreasa dobijeni su različiti, često

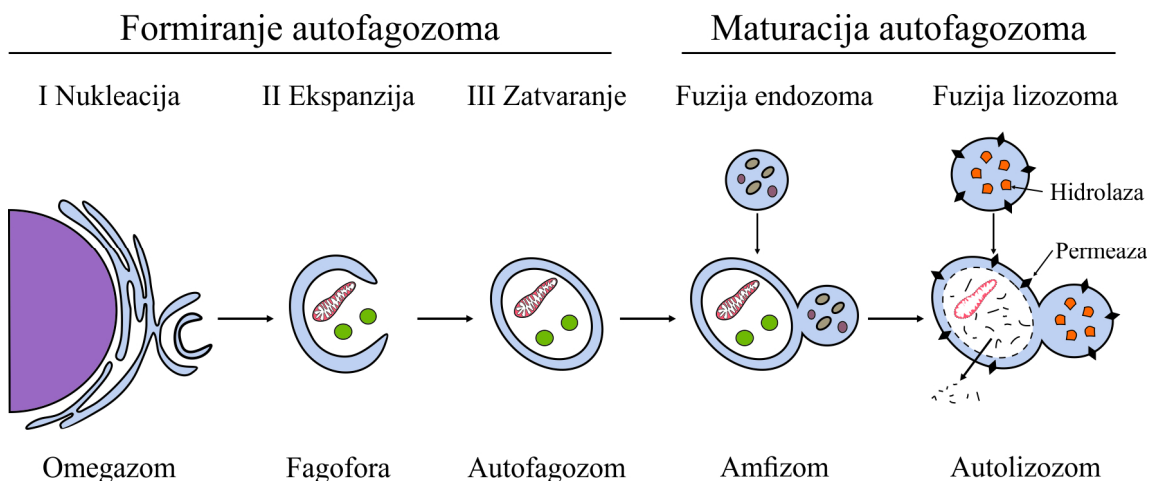
kontradiktorni rezultati. Rapamicin je u nekim studijama doveo do smanjenja insulinske rezistencije u dijabetesu,^{30,31,32} a u drugim do njenog povećanja.^{33,34,35}

Postoje tri tipa autofagije zavisno od načina na koji sadržaj predodređen za razgradnju ulazi u lumen lizozoma.^{36,37} mikroautofagija u kojoj sadržaj ulazi putem kasnih endozoma,^{38,39} autofagija posredovana šaperonima (engl. *Chaperone-mediated autophagy*, CMA) u kojoj proteini koji su predodređeni za razgradnju direktno ulaze u lizosome preko protein translokacionog kompleksa na lizosomalanoj membrani;⁴⁰ i makroautofagija.

Autofagija (makroautofagija) je lizosomalni put degradacije intracelularnih komponenti i oštećenih organela u fiziološkim uslovima i u uslovima ćelijskog stresa.^{25,41,42} Tokom autofagije veliki delovi citoplazme sa organelama mogu biti izolovani i razgrađeni,³⁶ što čini autofagiju značajnim kataboličkim procesom u ćeliji, koji štiti ćeliju od stresa, ali u određenim situacijama može doprineti regulisanoj ćelijskoj smrti^{36,43} ili ćelijskoj atrofiji.^{44,45,46} Autofagija igra i važnu ulogu u selektivnom uklanjanju specifičnih supstrata kao što je uklanjanje proteinskih agregata (agrefagija, engl. *aggrephagy*), patogena (ksenofagija, engl. *xenophagy*), mitohondrija (mitofagija, engl. *mitophagy*), peroksizoma (peksofagija, engl. *pexophagy*), lipidnih kapi (lipofagija, engl. *lipophagy*) i endoplazminog retikuluma (retikolofagija, engl. *reticulophagy*).^{47,48}

Autofagija započinje sekvestracijom različitih citoplazmatskih komponenti i formiranjem fagofore čiji se otvoreni krajevi fuzionišu i formiraju vezikulu sa dvostrukom membranom koja se naziva autofagozom.⁴¹ Sam proces formiranja autofagozoma prolazi kroz tri stadijuma: nukleaciju koja podrazumeva signalne puteve koji iniciraju stvaranje fagofore; elongaciju fagofore u kojoj dolazi do modeliranja membrana i sekvestracije sadržaja; i zatvaranje fagofore, tj. nastanak autofagozoma, autofagične strukture sa dvostrukom membranom.⁴⁷ Nakon formiranja, autofagozom se kreće duž mikrotubula do lizozoma sa kojima se spaja da bi se razgradio njegov sadržaj.⁴⁹ Ovaj proces se naziva maturacija autofagozoma (Slika 1.2.1).⁴⁷ Nakon degradacije unutrašnje membrane autofagozoma lizosomalnim hidrolazama, proces spajanja autofagozoma sa lizozomom je završen i proces degradacije sadržaja autofagozoma počinje.⁴⁹ Da bi došlo do aktivacije lizosomalnih hidrolaza i sledstvene degradacije sadržaja u autofagozomima, vakuolarna ATP-aza (V-ATP-aza), protonska pumpa,

održava pH u lizozomima niskim (4.5).⁵⁰ Nedavne studije pokazuju da blok u autofagičnom fluksu može nastati zbog poremećene lizozomalne funkcije koji vodi do lizozomalne ćelijske smrti β ćelija pankreasa.^{51,52}



Slika 1.2.1 Prikaz procesa autofagije. Modifikovano iz Søreng et al., 2018.

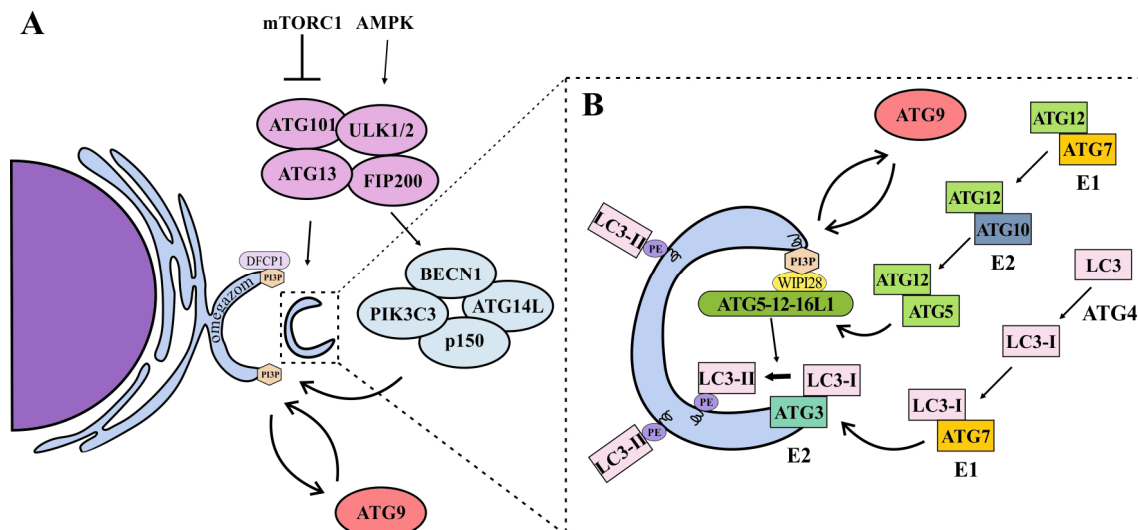
Autofagični proces se sastoji od niza molekularnih događaja koji dovode do formiranja autofagozoma i njegove fuzije sa lizozomima u autolizozom, autofagičnu strukturu sa jednostrukom membranom, i na kraju do razgradnje sadržaja u autolizozomu.^{21,53,54} Sam proces autofagije je regulisan produktima ATG gena (engl. *autophagy related genes*). Molekularni procesi uključeni u autofagiju su prvo istraženi kod gljivice *S. cerevisiae*. Uglavnom su dobro konzervirani i u višćelijskim organizmima uključujući i čoveka.⁵⁵

Proteini koji čine srž autofagične mašinerije ključni za proces nukleacije autofagozoma su ULK (engl. *unc-51-like kinase* – homolog ATG1 kod sisara) kompleks, Vps34/ PIK3C3 (engl. *class III phosphatidylinositol 3-kinase*) kompleks, dva ubikvitinu slična konjugaciona sistema koji dovode do konjugacije ATG12 i ATG5 i ATG8 sa fosfatidil-etanol-aminom (PE) u membrani fagofore, kao i transmembranski protein

ATG9.²¹ ULK1/2 kompleks se sastoji od ULK1/2, ATG101, ATG13, i FIP200⁵⁶ i aktivira ga AMPK (engl. *AMP-activated protein kinase*), odnosno inhibira aktivacija mTOR kompleksa 1 (mTORC1).⁴⁷ Ovaj kompleks je neophodan za prenos stres signala na mesto gde će biti formiran autofagozom, uglavnom u uslovima smanjene količine energije i hranljivih materija.^{21,56,57} ULK1/2 kompleks dalje aktivira kompleks PI3K klase III (PIK3C3/VPS34, beklina-1 (BECN1), ATG14L i p150), koji katališe reakciju stvaranja fosfatidilinozitol-3-fosfata.^{21,58,59} Formiranje fosfatidilinozitol-3-fosfata je ključni signal potreban za nukleaciju fagofore.⁵⁴ Fosfatidilinozitol-3-fosfat se formira na određenim domenima endoplazminog retikuluma koji se nazivaju omegazomi.⁴⁷ Omegazomi su strukture oblika polulopte od kojih najverovatnije nastaje fagofora.^{47,60,61,62} Za stabilnost VPS34 kompleksa neophodan je AMBRA1 (engl. *Autophagy And Beclin 1 Regulator*) protein, koga aktivira ULK1.²¹ U procesu formiranja autofagozoma, vrlo važna uloga je transmembranskog proteina ATG9 koji cirkuliše između mesta formiranja fagofore i perifernih rezervoara ATG9.²¹

Ekspanzija fagofore je proces u kome su najznačajniji proteini LC3/GABARAP (LC3 engl. *microtubule-associated light chain 3* – homolog ATG8 kod sisara) i ATG 12.^{21,54} U ovom procesu dolazi do modifikacije LC3 proteina putem kaskade regulisane E1 aktivirajućim enzimom ATG4, E2 konjugujućim enzimom ATG7 i LC3 proteazom ATG3, koja je vezana za membranu fagofore.⁶³ Paralelno sa procesom modifikacije LC3 proteina kroz niz reakcija konjugacije od ATG12 nastaje kompleks ATG5/ATG12/ATG16L1 (Slika 1.2.2).⁶³ LC3 interaguje sa kargo receptorima kao što je sekvestozom 1/p62 (SQSTM1/p62), koji omogućavaju selektivnost u procesu autofagije.⁶⁴

Fuzija autofagozoma i lizozoma je pod kontrolom proteina koji učestvuju i u endocitotskom putu kao što je VPS34 kompleks II koji se sastoji od BECN-1, VPS34, VPS15 i UVRAG (engl. *UV Radiation Resistance Associated Gene*).²¹ Ovaj proces je negativno regulisan RUBICON-om (RBCN, engl. *Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein*), koji se vezuje za VPS34.⁶⁵ Za ovu interakciju neophodna je aktivnost mTORC1.⁶⁵



Slika 1.2.2 Nukleacija i ekspanzija fagofore u ćelijama sisara. Modifikovano iz Søreng et al., 2018.

(A) Inicijacija autofagije po aktivaciji ULK1/2 je regulisana kinazama sensorima nutrijenata i energije AMPK i mTORC1. DFCEP1 je marker omegazoma. (B) ATG12 i LC3/GABARAP i njihovi sistemi konjugacije se vrše sekvencijalno i imaju ulogu u formiranju autofagozoma.

Jedan od glavnih regulatora autofagije su metaboličke potrebe ćelije. U uslovima kada u ćeliji ima dovoljno nutrijenata u ćelijama je aktiviran mTORC1 koji stimuliše anaboličke procese u ćeliji i inhibira kataboličke procese, odnosno inhibira autofagiju fosforilacijom ULK1 i ATG13, onemogućavajući time ULK kompleksu da aktivira sledeće ATG proteine u nizu.²¹ U gladovanju, inaktivni mTORC1 se oslobađa sa ULK1 i omogućava ULK1 da fosforiliše komponente svog kompleksa kao i druge proteine u procesu autofagije.⁶⁶ Pored dovoljne količine nutrijenata i faktori rasta aktiviraju mTORC1 i inhibiraju BECN-1,⁶⁷ inhibirajući time proces autofagije. Ograničenje energije u ćeliji, bilo zbog njene prevelike potrošnje ili nedostatka, stimuliše autofagiju.²¹ Visok odnos AMP/ATP aktivira LKB1/AMPK signalni put koji stimuliše kataboličke procese da proizvode ATP.⁶⁸ AMPK, senzor energetskog i nutritivnog statusa ćelije,⁶⁸ aktivira autofagiju putem fosforilacije ULK1 i BECN-1 i kontroliše endocitotsku i autofagičnu rezervu VPS34.²¹ AMPK, takođe, indirektno aktivira autofagiju fosforilacijom mTORC1 komponente RAPTOR-a i aktivacijom mTORC1 inhibitora TSC2.⁶⁸

Autofagija se može detektovati različitim mikroskopskim i molekularnim metodama. Imunoblot metodom se može detektovati ekspresija proteina, dok

kvantitativnom reakcijom lančanog umnožavanja cDNK dobijene reverznom transkripcijom (qRT-PCR, engl. *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) možemo detektovati ekspresiju gena uključenih u proces autofagije. Imunofluorescencom možemo obeležavati različite markere autofagije, kvantifikovati njihovo prisustvo i posmatrati njihov odnos sa drugim obeleženim komponentama u ćeliji. Jedina metoda koja omogućava posmatranje morfologije autofagičnih struktura je elektronska mikroskopija.²⁹ Primenom elektronske mikroskopije možemo videti autofagične strukture u njihovom prirodnom okruženju i odrediti njihovu poziciju u ćeliji, možemo precizno identifikovati autofagične strukture i kvantifikovati ih.²⁹

Na proces autofagije utiču hormoni insulin i glukagon koji se oslobađaju kao odgovor na visoke ili niske nivoe glukoze u krvi, ali i sam nivo glukoze utiče na proces autofagije nevezano od efekata ovih hormona.⁶⁹ Neki autori smatraju da glukoza inhibira autofagiju,^{70,71} dok su drugi pokazali da glukoza može da poveća nivo autofagije u različitim ćelijskim tipovima u dijabetesu.^{69,72} Glukoza stimuliše stvaranje V-ATP-aze podržavajući acidifikaciju lizozoma, ali u hiperglikemijskom miljeu dolazi do akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*), oštećenja mitohondrija i do stresa endoplazminog retikuluma.⁶⁹ Visok nivo masnih kiselina zajedno sa visokim nivoom glukoze u krvi dovodi do glikolipotoksičnosti koja inhibira autofagični fluks β ćelija pankreasa izazivajući njihovu smrt, najverovatnije zbog lizosomalne disfunkcije.⁶

1.3 Limfociti

Limfociti su ćelije imunskog sistema čiji udeo u ukupnom broju leukocita u perifernoj krvi iznosi 20-40%.⁷³ Limfociti predstavljaju heterogenu populaciju ćelija koja se međusobno razlikuje u mestu sazrevanja, ćelijskim markerima, specifičnim funkcijama, lokalizacijama u limfatičnom tkivu i u dužini životnog veka.^{73,74} Postoje tri funkcionalno različita tipa limfocita u organizmu koje je ultrastrukturno nemoguće međusobno razlikovati: T i B limfociti, koji pripadaju stečenoj imunosti i svojim receptorima prepoznaju specifične strane, ali i sopstvene antigene, i NK (engl. *natural*

killer) ćelije, koje pripadaju urođenoj imunosti i prepoznaju zaražene i tumorske ćelije koje ne ekspimiraju MHC-I molekule.^{73,74,75} Svi limfociti vode poreklo iz matičnih ćelija u kostnoj srži.⁷⁴ Limfociti u perifernoj krvi su uglavnom zreli T limfociti, koji čine 60-80% svih limfocita u krvi, B limfocita ima do 30%, dok 5-10% limfocita u krvi nema markere ni T ni B limfocita i ove ćelije predstavljaju NK ćelije i retke matične ćelije.⁷³

Na transmisionom elektronskom mikroskopu, limfociti su okrugle ćelije, veličine 7-12 μm , sa blago ugnutim heterohromatičnim nukleusom i tankim pojasom citoplazme u kome se nalaze uglavnom slobodni ribozomi i mitohondrije.^{74,75} U njihovoj citoplazmi može se uočiti i mala zona Goldžijevog aparata i retki mali lizozomi.^{74,75} Nuklearni hromatin je gusto pakovan, pogotovo na periferiji nukleusa.⁷⁴

Rezultati novijih istraživanja ukazuju na moguću ulogu inflamacije u patogenezi i progresiji dijabetesa.^{76,77} Danas se smatra da do gubitka β insulocita u tip 1 dijabetesu dolazi usled gubitka mehanizama koji regulišu toleranciju imunskog sistema i posledične ekspanzije autoreaktivnih T efektorskih limfocita.^{22,78,79} Nedavne studije pokazuju da je u patogenezi T2DM jedan od glavnih krivaca promenjena funkcija mononuklearnih ćelija periferne krvi zajedno sa hroničnom inflamacijom niskog stepena.⁸⁰

Promene u morfologiji ćelija kod T2DM bolesnika prvo su primećene u nedavnim eksfolijativnim citološkim studijama oralne mukoze.^{81,82} Autori ove studije ukazali su na činjenicu da dijabetes izaziva morfološke promene u ćelijama kao što su nepravilnosti u izgledu nukleusa i binukleacija.^{81,82} Elektronsko-mikroskopska studija ciliarnog epitela eksperimentalnih životinja sa dijabetesom takođe je pokazala promene u izgledu nukleusa koji su imali duboke useke, otvorene nuklearne pore i nepravilno raspoređen u heterohromatin.⁸³ Limfoidne ćelije sa izuvijanim nukleusima i kondenzovanim hromatinom duž nuklearne membrane prvi put su opisane u Sezary-jevom sindromu.⁸⁴ Ćelije morfologije slične onima u Sezary-jevom sindromu su nađene i u benignim inflamatornim bolestima kože, dermopatskoj limfadenopatiji i u malom procentu u limfocitima periferne krvi.^{85,86} Zbog svega prethodno navedenog, pretpostavilo se da su nepravilnosti izgleda nukleusa u normalnim humanim limfocitima *in vitro* rezultat aktivacije T limfocita.⁸⁷

Ranije publikovane, morfološke analize nukleusa u dijabetesu, radene su konvencionalnim kompjuterizovanim metodama koje su se fokusirale na veličinu

nukleusa i na nepravilnosti u njegovom obliku.^{81,82,83} Međutim, u analizi nukleusa kod pacijenata sa dijabetesom do sada nisu primenjene savremene i precizne metode analize, poput fraktalne analize, koja procenjuje kompleksnost nuklearnih struktura, i teksturalne analize, koja procenjuje homogenost polja hromatina u nukleusu. U našoj studiji, mi smo primenili ove metode u morfološkoj analizi nukleusa limfocita periferne krvi bolesnika sa T2DM.

Za održavanje metaboličkih funkcija limfocita u različitim stadijumima njihovog razvoja, od hematopoetskih stem ćelija do zrelih formi važna je autofagija. Autofagija mitohondrija i endoplazminog retikuluma je značajna u hematopoetskim stem ćelijama, reguliše prezentaciju peptida tokom razvoja limfocita u timusu i značajna je za sazrevanje i aktivaciju T limfocita.⁸⁸ Uloga autofagije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika sa T2DM je kontroverzna. Rezultati nekih studija ukazuju na činjenicu da se u mononuklearnim ćelijama periferne krvi aktivira autofagija, kao posledica oksidativnog stresa i stresa endoplazminog retikuluma,⁷² dok je u drugim studijama u ovim ćelijama detektovana snižena aktivnost autofagije u dijabetesu.⁸⁹

Detaljna ispitivanja ultrastrukturnih karakteristika, aktivacije i celularnih mehanizama uključenih u proces autofagije mononuklearnih ćelija periferne krvi osoba obolelih od T2DM, mogu doprineti boljem razumevanju složenih odnosa između morfoloških promena, aktivacije ćelija i procesa autofagije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ultrastruktorna morfometrijska analiza broja autofagičnih struktura u limfocitima periferne krvi bolesnika sa T2DM i korelacija rezultata dobijenih elektronskim mikroskopom sa ekspresijom proteina uključenih u proces autofagije.
2. Elektronsko mikroskopska analiza aktivacije limfocita i oštećenja subcelularnih struktura kod bolesnika sa T2DM.
3. Fraktalna analiza ultrastrukturnog izgleda nukleusa i citoplazme limfocita bolesnika sa T2DM.
4. Korelacija statusa autofagije sa aktivacijom i oštećenjem subcelularnih struktura u limfocitima bolesnika sa T2DM, kao i sa rezultatima dobijenim fraktalnom analizom nukleusa i citoplazme.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Odabir ispitanika

U ovoj studiji preseka, korišćeni su uzorci periferne krvi bolesnika sa novootkrivenim T2DM, bolesnika sa T2DM na terapiji metforminom i bolesnika sa T2DM na terapiji insulinom, ukupno 21 bolesnik. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze T2DM su bili vrednost glikemije našte $\geq 7,0$ mmol/l ili vrednost glikoziliranog hemoglobina (HbA_{1c}) $\geq 6,5\%$.³ Njihov odabir je bio konsekutivan na redovnim pregledima u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Kao kontrolni uzorci korišćeni su uzorci periferne krvi sedam zdravih osoba, odgovarajuće starosti, dobijeni u istoj ustanovi. Iz medicinske dokumentacije bolesnika su dobijeni podaci o polu, starosti bolesnika, osnovnoj bolesti i njenim eventualnim komplikacijama.

Kriterijumi za isključenje iz studije bili su:

- pridružene druge metaboličke bolesti;
- terapija statinima;
- pridružene maligne bolesti;
- nepristajanje bolesnika da učestvuje u studiji.

Prilikom redovnog pregleda bolesnika uzimano je 20 ml venske krvi za potrebe izolacije mononuklearnih ćelija i 5 ml krvi za potrebe analize biohemijskih parametara [glukoza, HbA_{1c}, ukupni holesterol, LDL (engl. *Low Density Lipoprotein*) holesterol, HDL (engl. *High Density Lipoprotein*) holesterol, trigliceridi] koja je vršena u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

Uzorci krvi su uzimani uz saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka broj 29/XII-5). Svaki od ispitanika je detaljno obavešten o cilju studije i dobrovoljno je potpisao pristanak za učestvovanje u ovoj studiji.

Analize dobijenih uzoraka periferne krvi su vršene na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, Institutu za mikrobiologiju i imunologiju i Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2 *Biohemijske analize krvi*

Uzorci periferne krvi korišćeni za određivanje nivoa glukoze i lipidnih parametara su uzimani u 8 sati ujutru iz lakatne vene, posle osmočasovnog posta. Vrednosti glukoze u krvi određivane su metodom glukozo-oksidge pomoću Beckman-ovog analizatora (Beckman Instruments, Fullerton, USA). Nivo HbA_{1c} je određivan kapilarnom elektroforezom (Sebia Capillarys, Evry Cedex, France). Lipidni parametri: koncentracije HDL holesterola, ukupnog holesterola i triglicerida su određivane upotrebom komercijalnih enzimskih kitova (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), dok je koncentracija LDL holesterola izračunavana pomoću standardne Friedewald-ove formule.

3.3 *Izolacija mononuklearnih ćelija*

Mononuklearne ćelije, limfociti i monociti, izolovane su iz 20 ml heparinizirane krvi bolesnika i zdravih osoba, pomoću gradijenta gustine (LymphoPrep, Axis Shield, Oslo, Norway). Nakon pažljivog nalivanja pune krvi na LymphoPrep, uzorci su centrifugirani 30 minuta na 650 g, na 21°C, sa srednjim ubrzanjem, bez uključene kočnice. Nakon centrifugiranja, u epruveti su jasno izdvojena četiri sloja: plazma sa trombocitima; beličasti prsten sa mononuklearnim ćelijama; sloj LymphoPrep-a; i talog eritrocita sa polimorfonuklearnim ćelijama (neutrofilni i eozinofilni granulociti). Automatskom pipetom je pažljivo skupljen beličasti prsten mononuklearnih ćelija i prenet u drugu epruvetu. Ćelije su po izdvajanju isprane tri puta u puferizovanom fiziološkom

rastvoru (PBS). Dobijena suspenzija mononuklearnih ćelija je podeljena i dalje procesirana za metode svetlosne i elektronske mikroskopije, metode protočne citometrije, imunoblot i qRT-PCR. Sve analize su urađene neposredno po izdvajanju mononuklearnih ćelija (*ex vivo*).

3.4 Priprema uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju (TEM)

3.4.1 Priprema uzorka i kalupljenje

Po ispiranju, ćelije su oborene centrifugiranjem u ependorf epruvetama i dobijeni ćelijski talog je fiksiran u 3% glutaraldehidu na +4°C tokom 24 sata. Nakon fiksacije ćelije su isprane 3 puta u kakodilatnom puferu (pH 7.3) da bi se uklonio glutaraldehid. Potom je ćelijski talog naliven sveže napravljenim 1% rastvorom osmijum-tetroksida u kakodilatnom puferu i ostavljen u frižideru na +4°C tokom 60 minuta radi dodatne fiksacije ćelijskih membrana. Ćelijski talozi su zatim ponovo isprani 3 puta kakodilatnim puferom i ostavljeni preko noći na +4°C u prezasićenom vodenom rastvoru uranil-acetata radi kontrastiranja. Sledećeg dana, ćelijski talog je ispran destilovanom vodom da bi se uklonio višak uranil-acetata. Potom je uzorak postepeno dehidriran rastućim koncentracijama etil alkohola (50%, 70%, 96%) na temperaturi od +4°C, zatim 100% etanolom i propilen-oksikom na sobnoj temperaturi. Po završenoj dehidraciji, ćelijski talozi su naliveni mešavinom propilen-oksida i epoksidnih smola (Epoxy Embedding Medium kit, 45345, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) u odnosu 3:1 i ostavljeni preko noći radi prožimanja tkiva smolom. Trećeg dana kalupljenja iz epruveta sa ćelijskim talogom je odlivena mešavina propilen-oksida i epoksidnih smola i nalivena je sveže napravljena smeša propilen-oksida i smola, ovaj put u odnosu 1:1. Uzorci su ostavljeni u ovoj mešavini smola 3 sata na sobnoj temperaturi. Po isteku 3 sata, iz epruveta je odlivena mešavina smola, uzorci su obeleženi stavljanjem papirića u epruvete, naliveni kombinacijom čistih epoksidnih smola i stavljeni u termostat na 60°C na pečenje u toku 48h.

3.4.2 *Sečenje uzoraka na ultramikrotomu*

Dobijeni kalupi su potom izvađeni iz ependorf epruveta i sečeni na ultramikrotomu (Leica UltraCut UCT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Na početku sečenja kalup se trimuje staklenim nožem, tj. uklanja se višak smole oko samog uzorka pažljivo da se uzorak ne bi oštetio. Po završenom trimovanju kalupa, pristupa se sečenju polutankih isečaka debljine oko 500nm. Dobijeni isecci se zatim hvataju i stavljaju na predmetna stakla. Predmetno staklo sa uzorcima se boji toluidin plavim i posmatra pod svetlosnim mikroskopom. Na svetlosnom mikroskopu se određuje koji deo kalupa će se seći za dalje analize. Zatim se kalup ponovo trimuje staklenim nožem dok se ne dobije regija od interesa u vidu piramide. Kada je formirana željena piramida uzima se dijamantski nož (16DIA.DU4530, DiATOME, Hatfield, PA, USA) i kalup se seče na debljinu od 70 nm. Dobijeni ultra-tanki isecci se zatim hvataju na bakarne mrežice (G4901, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) i ostavljaju da se osuše.

3.4.3 *Kontrastiranje mrežica*

Po sušenju mrežica, pristupa se njihovom kontrastiranju uranil-acetatom i olovo-citratom. Mrežica sa isečcima se prvo pažljivo stavlja na kap uranil-acetata u metanolu koja se nalazi na parafilmu (Parafilm M, Bemis NA, Neenah, WI, USA), okrenuta isečcima ka uranil-acetatu i ostavlja se na kapi 90 sekundi. Zatim se mrežica hvata pincetom i 60 puta brzo uranja u dejonizovanu vodu radi uklanjanja viška uranil-acetata. Ovaj postupak se ponavlja još jednom sa čistom dejonizovanom vodom. Potom se mrežica stavlja na kap sveže napravljenog olovo-citrata i ostavlja na njoj 45 sekundi. Po isteku vremena, mrežica se hvata pincetom i ponovo se 60 puta potapa u dejonizovanu vodu. Kada se mrežica ispere u dve dejonizovane vode, višak vode se nežno odstranjuje filter papirom i mrežica se ostavlja u nosač da se osuši.

Tako kontrastirane mrežice su zatim analizirane na transmisionom elektronskom mikroskopu (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, OR, USA).

3.5 Morfometrijske analize na transmisionom elektronskom mikroskopu

Ultratanki isečci i fotomikrografije sa TEM-a koje su korišćene za analizu, odabrane su primenom „*Systematic Uniform Random Sampling (SUR)*“⁹⁰ metode. Sve ćelije su fotografisane na uveličanju 8900x, najmanjem koje omogućava precizno razlikovanje kvantifikovanih struktura. U morfometrijsku analizu su uključeni samo preseki ćelija koji idu kroz centar ćelije sa prosečnim promerom od $7.30 \pm 1.00 \mu\text{m}$. Po svakom uzorku je fotografisano po 60 ćelija.

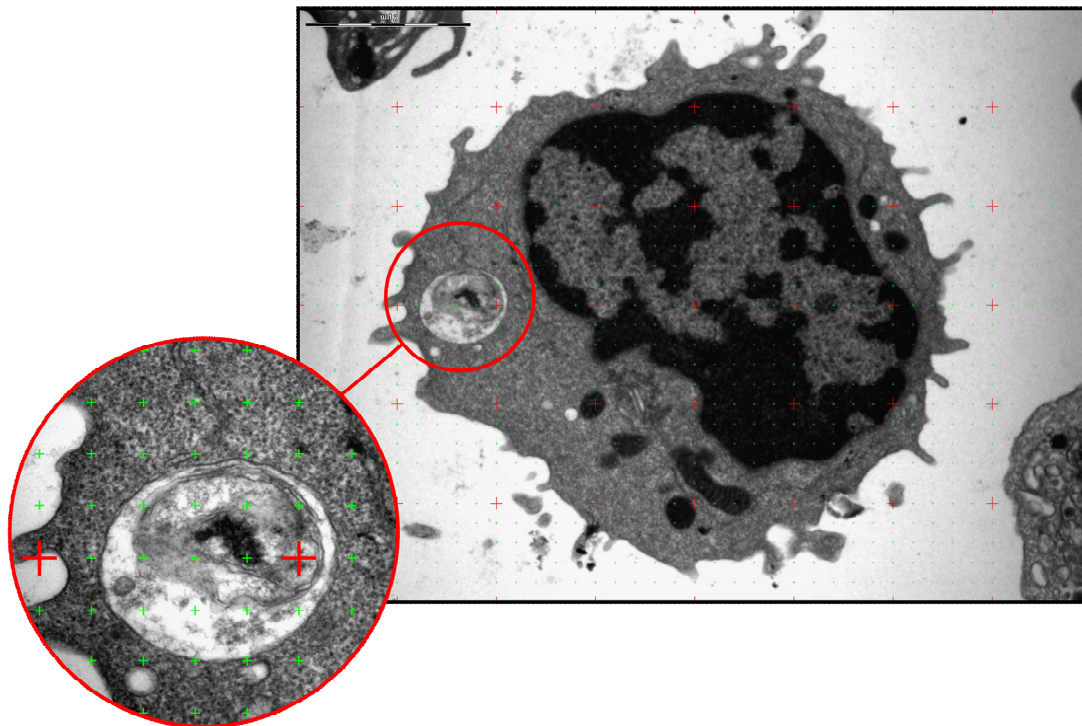
Na tako dobijenim fotomikrografijama analizirane su ultrastrukturne karakteristike ćelija i kvantifikovane su ćelijske organele. Kvantifikovan je broj mitohondrija, lipidnih kapi, autofagičnih struktura, multivezikularnih tela, kao i broj subnuklearnih struktura (nukleolusa, perihromatinskih granula, interhromatinskih granula i Cajal-ovih tela). Kao autofagične strukture su kvantifikovani autolizozomi, autofagozomi, fagofore, lipofagi i mitofagi. Fagofore i autofagozomi su kvantifikovani zajedno, s obzirom da obe strukture imaju dvostruku membranu i da se ne mogu razlikovati, osim ako se u preseku ne vide otvoreni krajevi fagofore. Na istim fotomikrografijama utvrđivano je prisustvo endoplazminog retikuluma i Goldžijevog aparata, kao i njihove karakteristike.

Analiza zapreminskog udela (engl. *Fractional Volume analysis*) citoplazme, autofagičnih struktura i lipidnih kapi u ćeliji je urađena primenom dvostruke „*coherent point*“ mrežice sa tačkama u dve različite gustine⁹⁰ primenom formule:

$$X = \frac{\Sigma P_{ap}}{(\Sigma P_{cyt} * \rho)}$$

u kojoj je: ΣP_{ap} broj tačaka mrežice veće gustine unutar željene strukture; ΣP_{cyt} broj tačaka mrežice manje gustine unutar citoplazme (ili cele ćelije); ρ konstanta označava broj tačaka veće gustine koji predstavlja svaku tačku manje gustine (25 u našem slučaju) (Slika 3.5). Primena ove mrežice u proceni volumena ćelijskih organela se zasniva na *Delesse*-ovom principu, po kojem je odnos površina citoplazme i organela na preseku

ćelije (engl. *fractional area*) proporcionalan odnosu zapremina citoplazme i organela u njoj (engl. *fractional volume*).⁹⁰

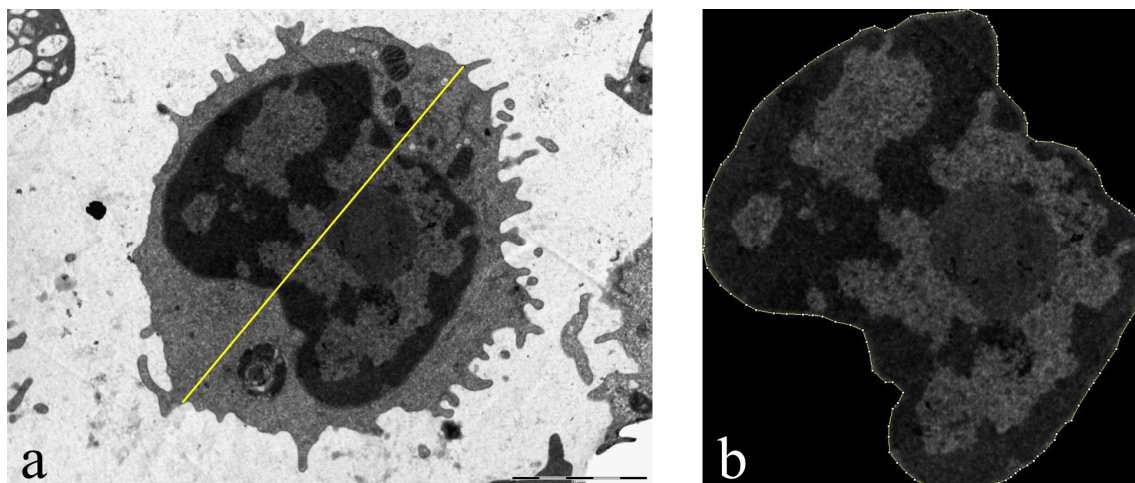


Slika 3.5 Izgled dvostruke „coherent point“ mrežice

3.6 Analiza oblika nukleusa

Na fotomikrografijama svakog uzorka sa TEM-a, na po 60 ćelija po uzorku, primenom programa *ImageJ* 1.49 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) izmeren je najveći promer ćelije primenom alatke za crtanje pravih linija (engl. *Straight Line Tool*) spajanjem dve najudaljenije tačke citoplazme i izražen je u mikrometrima (Slika 3.6a). Na svakoj fotomikrografiji nukleus ćelije je obeležen kao regija od interesa (ROI, engl. *Regions of interest*) (Slika 3.6b) primenom alata za poligonalnu selekciju (engl. *Polygon Selections Tool*).

Na tako dobijenoj selekciji su izračunati parametri oblika nukleusa: cirkularnost, oblost, solidnost i proporcije nukleusa (engl. *Circularity*, *Roundness*, *Solidity* i *Aspect Ratio*) putem opcije *Set Measurements/Shape descriptors*.



Slika 3.6 Merenje prečnika ćelije (a) i selekcija nukleusa (b)

Cirkularnost (engl. *Circularity*) se definiše kao stepen po kome oblik nukleusa liči na kružnicu, uzimajući u obzir glatkoću njegovog obima. Izračunava se po formuli:

$$Circularity = 4\pi \times \frac{[Area]}{[Perimeter]^2}$$

Vrednost 1 označava savršenu kružnicu, a vrednosti bliske nuli označavaju izrazito nepravilan oblik.^{91,92}

Oblost (engl. *Roundness*), kao parametar uopštenog oblika nukleusa, predstavlja odnos površine ROI i izračunate kružne površine najvećeg prečnika ROI-a. Što je vrednost oblosti bliža nuli to je oblik izduženiji.⁹³ Računa se po formuli:

$$Roundness = 4 \times \frac{[Area]}{\pi \times [MajorAxis]^2}$$

Proporcije nukleusa (engl. *Aspect Ratio*) su odnos najvećeg i najmanjeg prečnika elipse koja odgovara obliku ROI i izračunava se po formuli:⁹²

$$\text{Aspect Ratio} = \frac{[\text{Major Axis}]}{[\text{Minor Axis}]}$$

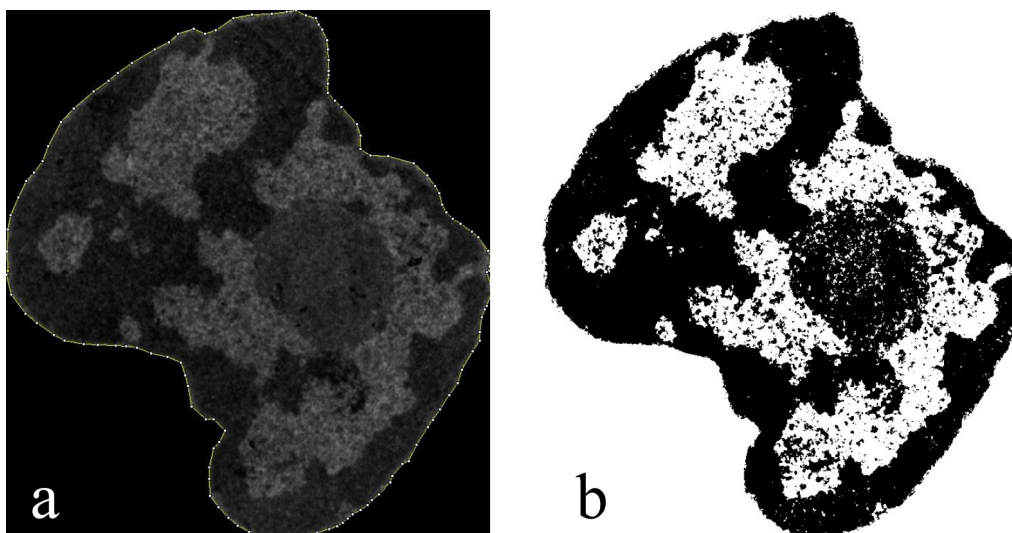
Solidnost (engl. *Solidity*), mera sveukupne konkavnosti ROI, definiše se kao:

$$\text{Solidity} = \frac{[\text{Cell Area}]}{[\text{Convex Hull Area}]}$$

Kako oblik nukleusa postaje solidniji, površina slike nukleusa i konveksna površina koja odgovara ROI, tj. nukleusu, približavaju se jedna drugoj dajući vrednost solidnosti 1.⁹²

3.7 Analiza površine heterohromatina

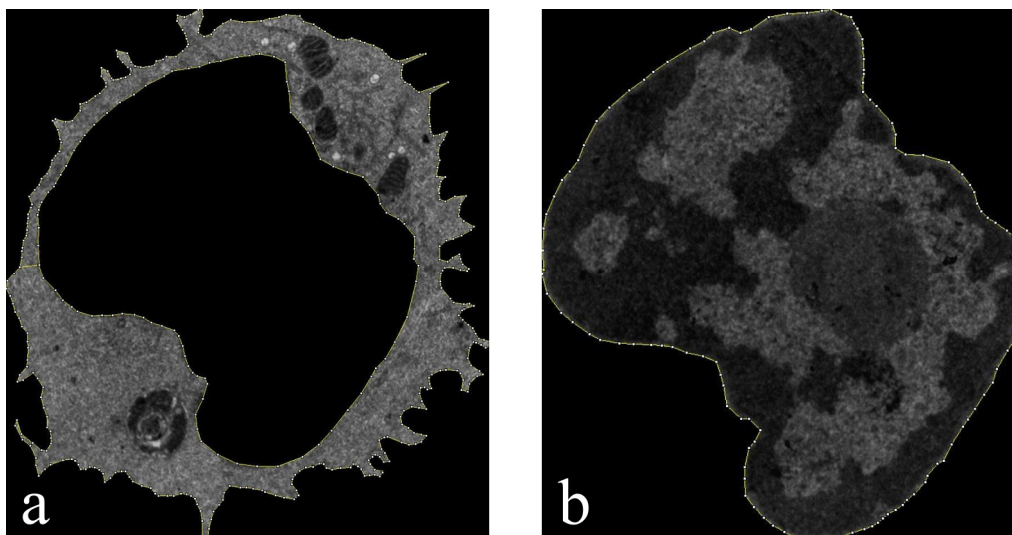
Površina heterohromatina u nukleusu je računata na fotomikrografijama sa selekcijom nukleusa kao regijom od interesa (Slika 3.7a). Na tako dobijenim selekcijama postavljen je prag tolerancije (engl. *Threshold*) koji odgovara tamnim poljima heterohromatina u nukleusu (Slika 3.7b) i izmeren procenat broja piksela u ROI putem opcije *Set Measurements/Area fraction*.



Slika 3.7 Selekcija nukleusa (a) i postavljeni prag tolerancije za heterohromatin (b)

3.8 Fraktalna analiza nukleusa i citoplazme

Ispitivanje fraktalne dimenzije citoplazme i hromatina u nukleusima mononuklearnih ćelija urađeno je na fotomikrografijama sa TEM-a sa odgovarajućim selekcijama regije od interesa: citoplazme (Slika 3.8a) ili nukleusa (Slika 3.8b).



Slika 3.8 Selekcija citoplazme (a) i nukleusa (b) za izračunavanje fraktalne analize

Parametri fraktalne analize, fraktalna dimenzija i lakunarnost, izračunati su primenom programa *ImageJ*, korišćenjem “*box counting*” metoda u dodatku za program *FracLac*.⁹⁴ Nakon binarizacije slike sa selekcijom odgovarajućeg ROI, fraktalni objekat je prekriven serijom kvadrata (engl. *boxes*) određene dimenzije ivice (ϵ).

Fraktalna dimenzija se izračunava korišćenjem logaritamskih vrednosti broja kvadrata (N) koji pokrivaju ispitivani objekat, kao i dimenzija ivica kvadrata (ϵ), nakon čega nastaje grafikon.⁹⁵ Vrednost fraktalne dimenzije (D_B) program izračunava sa nagiba procenjene regresione linije po formuli:

$$D_B = \text{regression slope}[\ln(N)/\ln(\epsilon)]$$

Fraktalna dimenzija odražava nivo kompleksnosti analizirane strukture.^{91,95}

Lakunarnost (Λ) je indirektna mera nivoa strukturnih praznina u fraktalnoj arhitekturi.^{91,95} Izračunava se po formuli:

$$\Lambda = CV_{\varepsilon,g}^2 = \left(\frac{\sigma}{\mu}\right)_{\varepsilon,g}^2$$

u kojoj μ označava srednju vrednost, σ standardnu devijaciju, ε veličinu ivice kvadrata, a g označava orijentaciju.

3.9 Teksturalna analiza nukleusa i citoplazme

Teksturalna analiza polja hromatina u nukleusu i citoplazme je urađena primenom GLCM (engl. *Gray level co-occurrence matrix*) metode, pomoću dodataka za *ImageJ* program: *Texture Analyzer*,⁹⁶ *GLCMTextureToo*⁹⁷ i uz pomoć *MATLAB* (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) softverskog kôda. Pre teksturalne analize, slike sa selekcijom ROI su pretvorene u 8-bitni format.⁹⁸ Za svaku strukturu hromatina i citoplazme kvantifikovano je po pet parametara GLCM analize: angularni drugi momenat (ASM, engl. *Angular Second Moment*), teksturalni kontrast (CON, engl. *GLCM contrast*), inverzni momenat razlike (IDM, engl. *Inverse Difference Moment*), teksturalna korelacija (COR, engl. *GLCM correlation*), i varijansa teksturalnog matriksa (VAR, engl. *GLCM variance*).

ASM je pokazatelj teksturalne uniformnosti i homogenosti. Izračunava se po formuli:

$$ASM = \sum_i \sum_j \{p(i,j)\}^2$$

gde su i j koordinate GLCM matriksa, μ srednja vrednost i σ standardna devijacija određene za par piksela $(p(i,j))$ ^{91,98} Kako homogenost raste, raste i vrednost ASM.

IDM, kao indirektni pokazatelj homogenosti se računa po formuli:^{91,98}

$$IDM = \sum_i \sum_j \frac{1}{1 + (i - j)^2} p(i, j)$$

VAR je indirektna mera heterogenosti čije vrednosti zavise od koeficijenta varijacije sivih vrednosti.⁹¹ Računa se po formuli:

$$VAR = \sum_i \sum_j (i - \mu)^2 p(i, j)$$

COR se računa po formuli:⁹⁸

$$COR = \frac{\sum_i \sum_j (ij) p(i, j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

Korelacija predstavlja meru linearne povezanosti između susednih sivih polja.

CON je obrnuto proporcionalan IDM i procenjuje razliku sivih vrednosti, a računa se po formuli:⁹¹

$$CON = \sum_i \sum_j (i - j)^k P_d[i, j]^n$$

3.10 Procena autofagije na konfokalnom mikroskopu

Primenom konfokalne mikroskopije (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*) je analizirana ko-lokalizacija LC3B, kao markera autofagije, i mitohondrija ili lizozoma.

Po izdvajanju mononuklearnih ćelija iz periferne krvi 10 µl ćelijske suspenzije je inkubirano 15 minuta na 37°C sa 100 nM MitoTracker™ Red CMXRos (M7512, Life

Technologies), intravitalnom bojom za mitohondrije, ili 60 minuta na 37°C sa 100 nM LysoTracker™ Red DND-99 (L7528, Life Technologies), intravitalnom bojom za lizosome, u RPMI 1640 ćelijskom medijumu sa dodatkom fetalnog goveđeg seruma (5%, engl. *fetal bovine serum*, FBS). Nakon ispiranja u PBS-u, po jedna kap (5 µl) tako obojene ćelijske suspenzije je naneta na SuperFrost™ pločice (Menzel Gläser GmbH, Braunschweig, Germany) i osušena na vazduhu. Uzorak je zatim fiksiran 4% paraformaldehidom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja PBS-om, ćelije su permeabilizovane metanolom na -20°C tokom 10 minuta. Nakon ispiranja PBS-om, blokiranje nespecifičnog vezivanja antigena vršeno je tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi inkubacijom ćelija sa 5% normalnim kozijim serumom sa 0,3% Triton X-100. Ćelije su isprane PBS-om i inkubirane sa primarnim anti-LC3B antitelom konjugovanim sa DyLight 488 (1:2000, PA5-22938, Invitrogen, Paisley, UK) u nosaču (1% goveđi serum albumin (BSA, engl. *bovine serum albumine*) u PBS-u sa 0.3% Triton X-100) tokom 90 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon finalnog ispiranja PBS-om, pločice se pokrivene Flouromount-G (0100–01, SouthernBiotech) i posmatrane na Leica TCS SP2 konfokalnom mikroskopu (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) korišćenjem FITC-TRITC kombinacije lasera i PL APO 63x 1.3 Glycerol HCX CS objektiva sa dodatnim 4x digitalnim uveličanjem.

Broj mitofaga je određivan kao broj ko-lokalizovanih (žutih) punkta na uveličanju x252 na 20 vidnih polja biranih SUR metodom na pločicama bojenim sa *MitoTracker*-om (crvena punkta) i LC3B (zelena punkta). Broj autolizozoma je određivan po istim principima na pločicama bojenim sa *LysoTracker*-om (crvena punkta) i LC3B (zelena punkta). Kvantifikacija zelenih LC3B punkta vršena je manuelno na slikama sa pločica obojenih *MitoTracker*-om i LC3B. Pre brojanja punkta na svim slikama su podešeni kontrast i osvetljenost na iste vrednosti u *Adobe Photoshop* programu korišćenjem opcija *Image/Adjustments/Brightness/Contrast* i *Image/Adjustments/Levels*. Određivanje broja lizozoma, tj. crvenih punkta *LysoTracker*-a je vršeno po istim principima na slikama sa pločica obojenih sa *LysoTracker*-om i LC3B.

3.11 Kvantifikacija kiselih vezikula primenom protočne citofluorimetrije

Nakon izdvajanja mononuklearnih ćelija, 100 µl ćelijske suspenzije je pripremljeno za analizu količine kiselih vezikula na protočnom citometru (engl. *fluorescence-activated cell sorting*). Povećanje kiselosti citoplazme, kao pokazatelj porasta broja ili zapremine kiselih vezikula, autolizozoma, analizirano je protočnom citofluorimetrijom sa pH senzitivnom bojom akridin oranžom. Akridin oranž emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3) u kontaktu sa kiselim autolizozomima, dok na neutralnom pH, kakav je u citoplazmi, fluorescira zeleno (FL1). Izračunavanjem relativnog odnosa intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) prema njihovom odnosu u kontrolnim ćelijama procenjeno je da li je došlo do povećanja broja kiselih vezikula, tj. autolizozoma.⁹⁹ Analiza protočnom citofluorimetrijom vršena je na FACSCalibur protočnom citometru i *Cell-Quest-Pro* softveru (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Za potrebe protočne citofluorimetrije mononuklearne ćelije su inkubirane 15 minuta sa 1 µM akridin oranžom (318337, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na 37°C. Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u 500 µl PBS-a i analizirane na protočnom citometru.

3.12 Imunoblot analiza

Primenom imunoblota (Western blot) analizirano je prisustvo autofagije i modulacija signalnih puteva uključenih u proces njene regulacije, kvantifikacijom nivoa ekspresije i aktivacije (fosforilacije) intracelularnih proteina iz ukupnog ćelijskog ekstrakta.

Izdvajanje proteina vršeno je liziranjem ćelija na ledu tokom 30 minuta u sveže pripremljenom puferu za lizu ćelija sa dodatkom inhibitora proteaza i fosfataza (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*), 20 µl/ml koktela proteaznih inhibitora (Sigma-Aldrich), 2 mM natrijum ortovanadat (Na₃VO₄) i 50 mM natrijum fluorid (NaF)). Potom su ćelijski lizati centrifugirani na +4°C, na 14000 g, 15 minuta. Supernatant je prikupljen i

koncentracija proteina u njemu je određena metodom po Bradford-u,¹⁰⁰ koja se zasniva na promeni boje Coomassie Brilliant Blue G-250 iz crvene u plavu, nakon vezivanja za proteine u kiseloj sredini. Kao standard je korišćen BSA. Reakcija je izvođena mešanjem 980 µl Bradford-ovog reagensa (0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% (v/v) etanol, 10% (v/v) H₃PO₄ u vodi) sa 20 µl uzorka. Posle 10 minuta očitana je apsorpcija na čitaču za mikrotitarske ploče na talasnoj dužini od 570 nm i koncentracija proteina u uzorku je izračunata u odnosu na standardnu krivu.

Za elektroforezu, uzorci su pripremljeni kuvanjem 5 minuta na 95°C određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka. Finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% natrijum dodecil sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*), 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0,002% bromfenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8. Kuvanjem su denaturisani proteini i obloženi negativno naelektrisanim molekulima SDS-a, što daje svim proteinima isto naelektrisanje i isti elipsoidni oblik, te omogućava njihovo razdvajanje samo na osnovu mase tokom njihovog kretanja u električnom polju. Dodatak 2-merkaptotetanolu u pufer sprečava formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Tehnikom denaturišuće gel elektroforeze (SDS-PAGE) proteini iz skuvanih uzorka su razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama na 10% (za analizu Atg5, Beklina-1, p62/SQSTM1 i β-aktina) i 12% (za analizu LC3 proteina i β-aktina) poliakrilamidnom gelu.

Jednake količine proteina su sipane u bunare (od 10 µg do 50 µg, zavisno od analiziranog proteina). Zatim su uzorci nanošeni na gel za sabijanje proteina (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris HCl, pH 6.8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris HCl, pH 8.8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijum persulfat i 0,033% N,N,N',N'-tetrametiletlen-1,2-diamin (engl. *N,N,N',N'-tetramethylethylene-1,2-diamine*), dok se pufer za rezervoare u kojima je tekla elektroforeza sastojao od 192 mM glicina, 0,1% SDS i 25 mM Tris HCl, pH 8.3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 minuta pri konstantnom naponu. Tokom prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a posle prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska fronta boje bromfenol plavo sa gela. Na svaki gel

je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekularnih masa (10-250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) u cilju određivanja pozicija molekularnih težina ispitivanih proteina. Odmah po završetku elektroforeze izvršen je transfer proteina sa gela pomoću aparature za polusubi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences) na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 1-2 minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) i postavljene u aparaturu na visoko adsorbujući filter papir prethodno natopljen transfer puferom. Gelovi su isprani malom količinom istog pufera i pažljivo postavljeni na membrane. Preko gela je stavljen još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi. Takvim položajem membrane i gela je omogućeno da, pod dejstvom struje konstantne jačine (0,8 mA/cm² membrane), negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na putu ka anodi membrana je zaustavljala proteine vezujući ih za sebe. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi i trajao je ukupno 90 minuta. Po završenom transferu, nespecifično vezivanje antitela je blokirano inkubacijom delova membrane sa proteinima od interesa u rastvoru 10% obranog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) sa 0,05% Tween 20 deterdženta (TBST) na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta. Membrane su zatim inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom u 5% obranom mleku preko noći na temperaturi od +4°C, uz blago mešanje. Korišćena su sledeća razblaženja antitela u rastvoru za blokiranje: 1:900 za anti-LC3, 1:1000 za anti-Beclin 1 i anti-ATG5, 1:2000 za anti-SQSTM1/p62 i 1:5000 za anti-β-aktin (sva antitela su proizvođača Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Sutradan, nakon tri ispiranja u TBST-u od 5min, membrane su inkubirane na sobnoj temperaturi 75 minuta sa sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG antitelom (Jackson IP Laboratories, West Grove, PA) konjugovanim sa peroksidazom rena. Nakon završene inkubacije, membrane su isprane tri puta sa TBST-om i prelivane 3 minuta sa hemiluminiscentnim reagensom (ECL; GE Healthcare), supstratom za peroksidazu rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). HRP sa sekundarnog antitela je razgrađivala H₂O₂ iz supstrata do kiseonika i vode. Tako nastali kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminoftalata, koji je emitovao foton. Emitovana svetlost je detektovana korišćenjem aparata za detekciju hemiluminiscence (ChemiDoc Imager, Bio-Rad), a intenzitet tako nastale

hemiluminiscence je bio direktno proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Ekspresija proteina, tj. relativna optička gustina imunoreaktivnih traka proteina je kvantifikovana denzitometrijom korišćenjem *Image Lab* softvera i prikazana relativno u odnosu na aktin. Rezultati su predstavljeni kao promena intenziteta signala u odnosu na zdravu kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

3.13 Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije

3.13.1 Izolacija RNK

Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi je vršena pomoću TRIzol™ (15596026, Invitrogen, Paisley, UK) reagensa. Po izdvajanju mononuklearnih ćelija odliven je supernatant i u epruvetu (1,5 ml) je dodato 250 µl TRIzol™-a, u kome su ćelije resuspendovane provlačenjem kroz nastavak automatske pipete. Inkubacija ćelija sa TRIzol™-om je vršena 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 50 µl hloroforma u epruvetu, uzorci su intenzivno izmešani, inkubirani 10 minuta na +4°C, a zatim centrifugirani na +4°C, na 12000 g, 15 minuta. Po završenom centrifugiranju jasno su se izdvajale tri faze: gornja vodena sa RNK, intermedijarna sa DNK, i donja hloroformska sa proteinima i lipidima. Zatim je vodena faza sa RNK skupljena u epruvetu i dodata joj je istovetna zapremina izopropanola. Posle inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, rastvor RNK i izopropanola je centrifugiran na +4°C, na 12000 g tokom 15 minuta, nakon čega se na dnu epruvete formirao talog RNK. Po odlivanju supernatanta, talog je opran 70% etanolom dva puta po 5 minuta na 7500 g. Etanol je odliven automatskom pipetom, a talog RNK je sušen do isparenja celokupnog etanola (oko 5 minuta) nakon čega je rastvaran u destilovanoj vodi.

3.13.2 Reverzna transkripcija

Koncentracija RNK je određivana na Gene Quant spektrofotometru nakon čega je 1 µg RNK rastvaran u 15 µl destilovane vode sa 0,2 µg nasumičnih prajmera (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania) u finalnoj koncentraciji 1 mM. Kontrola kontaminacije uzorka je vršena vodom korišćenom za rastvaranje kao uzorkom umesto RNK. Zatim su rastvori inkubirani 10 minuta na 70°C, a tokom inkubacije su se heksameri nasumično vezivali za RNK. Nakon inkubacije uzorci su stavljeni 5 minuta na led i u njih je dodato po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (5 x First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1 µl M-MuLV reverzne transkriptaze (200 U/µl, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Potom su uzorci inkubirani 10 minuta na 25°C; 60 minuta na 42°C, na temperaturi na kojoj se odigravala reakcija reverzne transkripcije; i na kraju 10 minuta na 70°C, kada je reakcija reverzne transkripcije prekinuta. Tako dobijena cDNK je u rastvorenom stanju čuvana na +4°C, do upotrebe u reakciji qRT-PCR.

3.13.3 qRT-PCR

qRT-PCR analiza je urađena na Realplex2 Mastercycler-u (Eppendorf, Hamburg, Germany), u pločama sa 96 bunara korišćenjem TaqMan Universal PCR Master Mix-a (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), i sledećih TaqMan proba (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA): ATG3, ATG4b, ATG7, ATG10, ATG13, ATG14, AMBRA1, ATF4 (engl. *Activating Transcription Factor 4*), BECN1, BCL2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), RB1CC1/FIP200 (engl. *Phosphatase 1, Regulatory Subunit 131/RB1-inducible coiled-coil 1*), FOXO1 (engl. *Forkhead box protein O1*), FOXO3, GABARAP (engl. *GABA Receptor-Associated Protein*), RUBICON, SQSTM1/p62, ULK1, UVRAG, PIK3C3/Vps34 i 18S ribozomalna RNK (RN18S).

Inicijalni korak RT-PCR je bio 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala polimeraza. U reakciji je bilo 40 ciklusa koji su se sastojali od 15 sekundi topljenja na 95°C, za kojima je sledio 1 minut vezivanja prajmera za DNK i sinteze DNK lanaca na 60°C. Sve reakcije su rađene u triplikatu i uslovi za njihovo izvođenje su bili po preporuci proizvođača.¹⁰¹ Relativna ekspresija gena je dobijena po formuli $2^{-\Delta CT}$, a ΔCt je dobijen kao razlika prosečnih Ct vrednosti triplikata gena od interesa i prosečne Ct vrednosti kontrolnih

triplikata (RN18S). Dobijeni rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na kontrolu, čija je vrednost arbitrarno podešena na 1.

3.14 Statistička analiza

Deskripcija numeričkih obeležja je urađena klasičnim metodama opisne statistike, aritmetičkom sredinom, i odgovarajućim merama varijabiliteta, standardnom devijacijom. U analizi rezultata, primenjen je Studentov T-test, ako su rađenja poređenja dve grupe, ili analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey HSD post-hock testom, za poređenje više grupa. Za procenu statističke značajnosti korelacije je korišćen Pearson-ov koeficijent korelacije.

Statistička analiza je urađena pomoću SPSS programa (Chicago, IL, USA). Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom, a $p < 0,01$ visoko statistički značajnom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Za grafički prikaz rezultata korišćen je Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, WA, USA).

4. REZULTATI

4.1 *Karakteristike ispitanika*

Ispitanici su podeljeni u četiri grupe: novootkriveni T2DM bolesnici koji nisu primali nikakvu terapiju za dijabetes; T2DM bolesnici lečeni metforminom; T2DM bolesnici lečeni insulinom; zdravi ispitanici. Svaka grupa imala je po sedam ispitanika, ukupno 28. Vrednosti HbA_{1c} su se visoko statistički značajno razlikovale između kontrolne grupe i T2DM bolesnika na terapiji metforminom ($p < 0,01$) ili insulinom ($p < 0,01$), kao i između novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika na terapiji insulinom ($p < 0,01$). Statistički značajna razlika u vrednostima HbA_{1c} je utvrđena i između novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika na terapiji metforminom ($p < 0,05$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u HbA_{1c} vrednostima između kontrolne grupe i novootkrivenih T2DM bolesnika. Vrednosti glukoze našte i indeksa telesne mase pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne grupe i bolesnika sa T2DM na terapiji insulinom ($p < 0,05$), dok između ostalih ispitivanih grupa nema statistički značajne razlike. Nivo insulina u krvi određivan je za kontrolnu grupu i za novootkrivene T2DM bolesnike i dobijena je statistički značajna razlika između te dve grupe ($p < 0,05$). Ispitanicima na terapiji metforminom i insulinom nije određivan nivo insulina u krvi zbog primenjene terapije. Nivo triglicerida u krvi se statistički značajno razlikovao između bolesnika na terapiji metforminom i grupe novootkrivenih bolesnika ($p < 0,05$), kao i između bolesnika na terapiji metforminom i kontrolne grupe ($p < 0,05$). Između ostalih grupa nije bilo statistički značajne razlike u nivou triglicerida u krvi. Grupe ispitanika se međusobno statistički značajno ne razlikuju u broju godina i vrednostima ukupnog holesterola, LDL-a i HDL-a ($p > 0,05$). Uvidom u istoriju bolesti bolesnika sa T2DM koji su lečeni metforminom utvrđeno je da je prosečno trajanje bolesti u trenutku uzimanja krvi bilo 6,7 godina i da su bili bez komplikacija, osim jednog bolesnika koji je imao polineuropatiju. Prosečno trajanje bolesti kod bolesnika lečenih insulinom je 24 godine, svi ispitanici su od komplikacija imali prisutnu polineuropatiju, polovina je imala prisutnu i retinopatiju, a trećina je imala prisutne i druge komplikacije kao što su nefropatija i

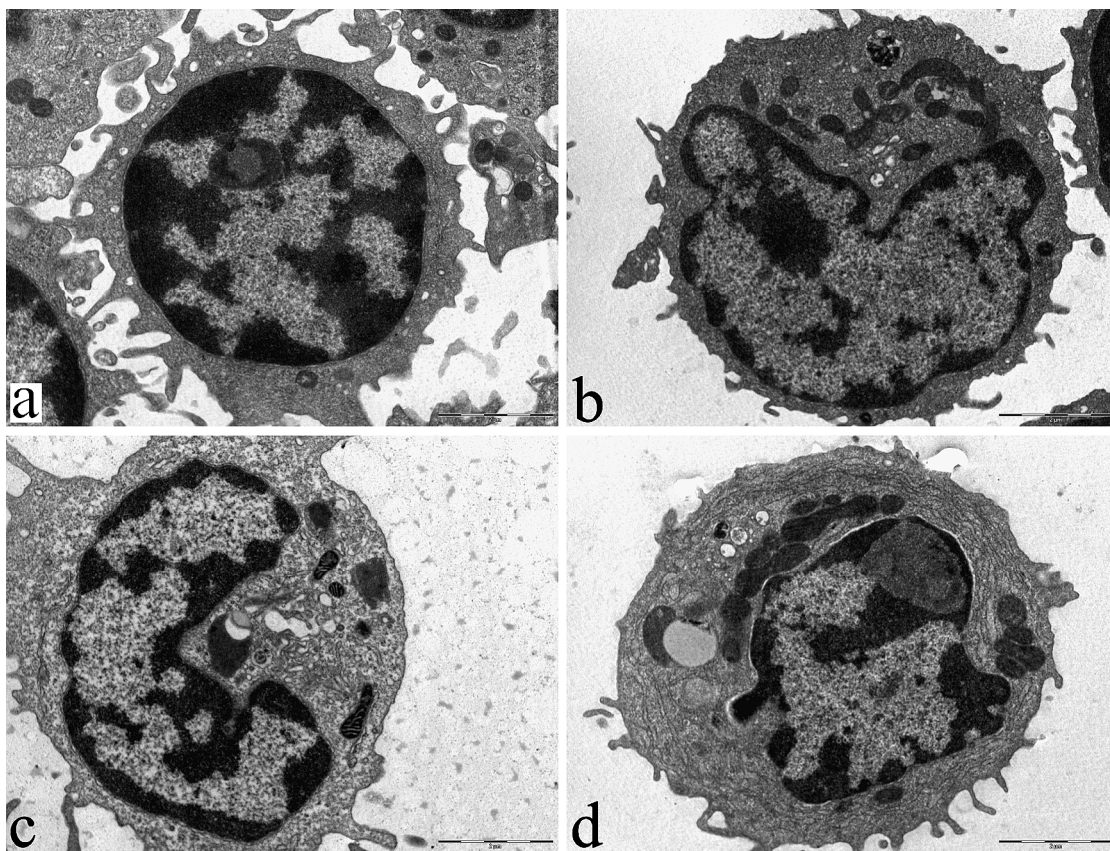
različite vaskularne komplikacije. Demografske karakteristike i prosečne vrednosti biohemijskih parametra ispitanika po grupama dati su u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Karakteristike ispitanika po grupama

	Zdrave osobe	Novootkriveni T2DM bolesnici	T2DM bolesnici lečeni metforminom	T2DM bolesnici lečeni insulinom
N	7	7	7	7
Pol (M/Ž)	2/5	3/4	3/4	2/5
Godine	55 ± 5	59 ± 9	58 ± 15	66 ± 5
Indeks telesne mase	24.3 ± 3.8	28.7 ± 3.3	29.2 ± 3.1	30.2 ± 3
Glukoza našte (mmol/l)	5.4 ± 0.2	7.2 ± 1.7	9.9 ± 4.4	14.5 ± 10
HbA _{1c} (%)	5.2 ± 0.3	6.4 ± 1	9.1 ± 2.8	10 ± 0.7
Insulin (pmol/l)	53.2 ± 12.2	107.2 ± 46.6	/	/
Trigliceridi (mmol/l)	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.6	3.1 ± 1.4	1.8 ± 0.9
Ukupni holesterol (mmol/l)	4.7 ± 1.5	5.9 ± 1.8	6.2 ± 1.2	4.6 ± 1.2
LDL-holesterol (mmol/l)	3.2 ± 1.1	4.1 ± 1.8	3.8 ± 0.9	2.6 ± 1.1
HDL-holesterol (mmol/l)	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.07 ± 0.2	1.4 ± 1.1

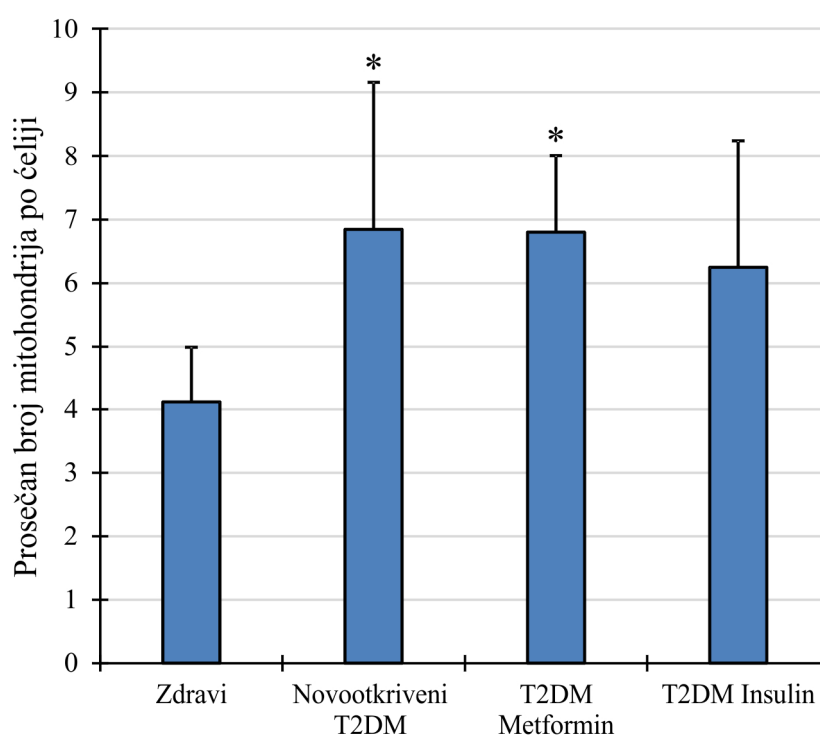
4.2 Morfometrijske analize na transmisionom elektronskom mikroskopu

Prosečna veličina limfocita iznosila je u kontrolnoj grupi ispitanika $7,26 \pm 0,2 \mu\text{m}$, u grupi ispitanika sa novootkrivenim T2DM $7,27 \pm 0,43 \mu\text{m}$, u grupi ispitanika sa T2DM na terapiji metforminom $6,97 \pm 0,35 \mu\text{m}$ i u grupi ispitanika sa T2DM na terapiji insulinom $7,50 \pm 0,62 \mu\text{m}$. Nije bilo statistički značajne razlike u veličini limfocita između ispitivanih grupa. Limfociti zdravih osoba su imali okrugle, predominantno heterohromatične nukleuse i malu količinu citoplazme sa retko prisutnim organelama, dok su limfociti T2DM bolesnika imali euhromatične nukleuse nepravilnog oblika i veći broj organela prisutnih u citoplazmi (Slika 4.2.1). Volumenski udeo citoplazme u ćeliji je bio $48,18\% \pm 2,95$ kod zdravih ispitanika, $49,76\% \pm 2,77$ kod novootkrivenih T2DM bolesnika, $48,70\% \pm 1,53$ kod T2DM bolesnika lečenih metforminom i $51,28\% \pm 3,30$ kod T2DM bolesnika lečenih insulinom. U volumenskom udelu citoplazme u ćeliji nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.



Slika 4.2.1 Izgled limfocita kod zdravih ispitanika (a), novootkrivenih T2DM bolesnika (b), T2DM bolesnika lečenih metforminom (c) i T2DM bolesnika lečenih insulinom (d)

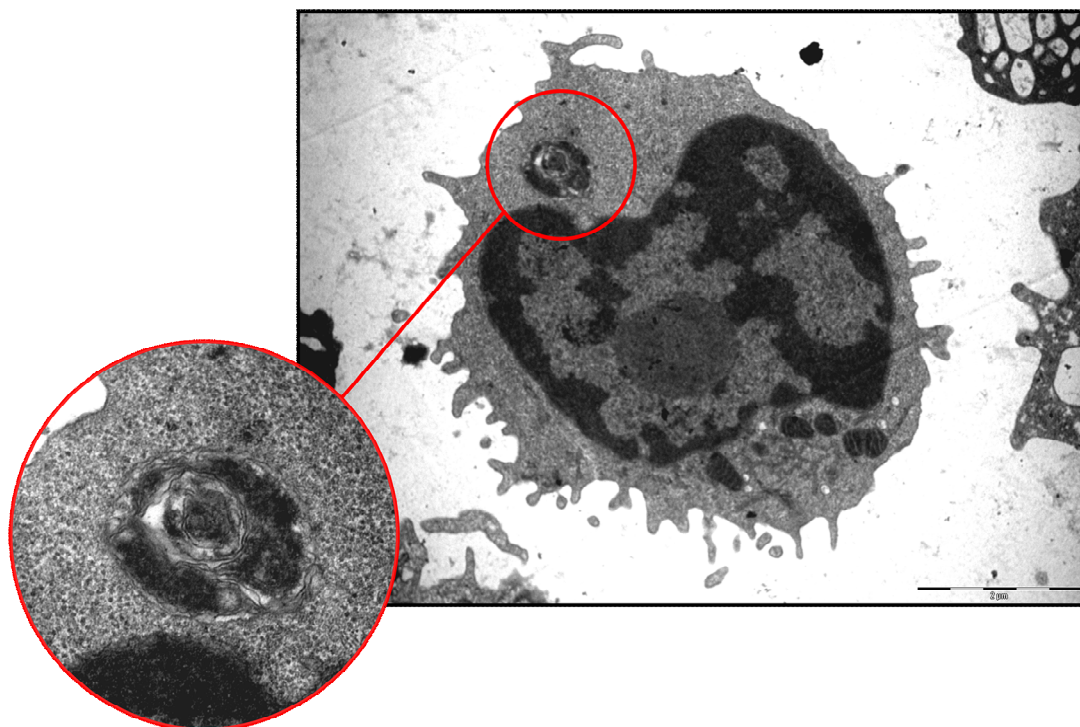
U limfocitima novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom je bilo statistički značajno više mitohondrija na preseku ćelije u odnosu na zdrave ispitanike ($6,85 \pm 2,31$; $6,80 \pm 1,21$; $4,12 \pm 0,88$ respektivno, $p < 0,05$) (Grafikon 4.2.1). Nije bilo statističke razlike između T2DM bolesnika lečenih insulinom ($6,25 \pm 1,99$) i ostalih ispitivanih grupa. Dilatacija endoplazminog retikuluma je češće viđena kod novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom (4/7 ispitanika) u odnosu na zdrave ispitanike i T2DM bolesnike lečene insulinom (2/7 ispitanika).



Grafikon 4.2.1 Prosečan broj mitohondrija po ćeliji. Statistički značajno povećanje broja mitohondrija u limfocitima novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike. * $p < 0,05$

Vrednosti morfometrijske analize broja i volumena lipidnih kapi za zdrave ispitanike su bile $3,43 \pm 2,23$; $0,05 \pm 0,04$ respektivno; za novootkrivene T2DM bolesnike $2,86 \pm 2,04$; $0,03 \pm 0,01$ respektivno; za T2DM bolesnike lečene metforminom $6 \pm 3,92$; $0,09 \pm 0,07$ respektivno; i za T2DM bolesnike lečene insulinom $5,57 \pm 2,99$; $0,08 \pm 0,1$ respektivno. Uočeno je smanjenje broja i volumena lipidnih kapi u grupi novootkrivenih T2DM bolesnika, ali ono nije bilo statistički značajno. Povećanje broja i volumena lipidnih kapi kod lečenih T2DM bolesnika takođe nije statistički značajno.

U citoplazmi bolesnika sa T2DM uočeno je više autofagozoma sa dvostrukom membranom i autolizozoma sa jednostrukom membranom (Slika 4.2.2) koji su sadržali različite citoplazmatske komponente, kao što su lipidne kapi i mitohondrije, u odnosu na zdrave ispitanike.



Slika 4.2.2 Izgled limfocita kod novootkrivenih T2DM bolesnika. Uvećani detalj prikazuje autolizozom sa citoplazmatskim sadržajem u različitim stepenima razgradnje. (8900x, detalj 36000x)

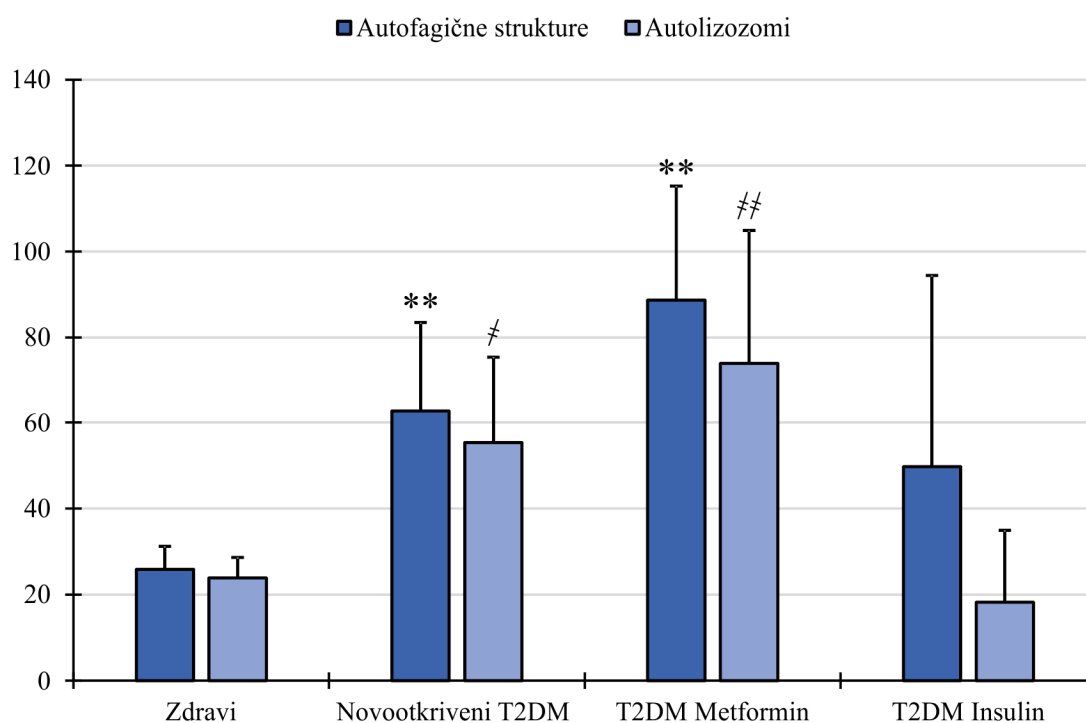
Kvantifikacija autofagičnih struktura na transmisionom elektronskom mikroskopu pokazala je statistički visoko značajno povećanje ukupnog broja autofagičnih struktura kod novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$) (Grafikon 4.2.2). Nema razlike između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih insulinom. Vrednosti morfometrije su date u Tabeli 4.2.1.

Dalja analiza je pokazala statistički visoku značajnu razliku u broju autolizozoma između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($p < 0,01$) i statistički

značajnu razliku između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika ($p < 0,05$) (Grafikon 4.2.2).

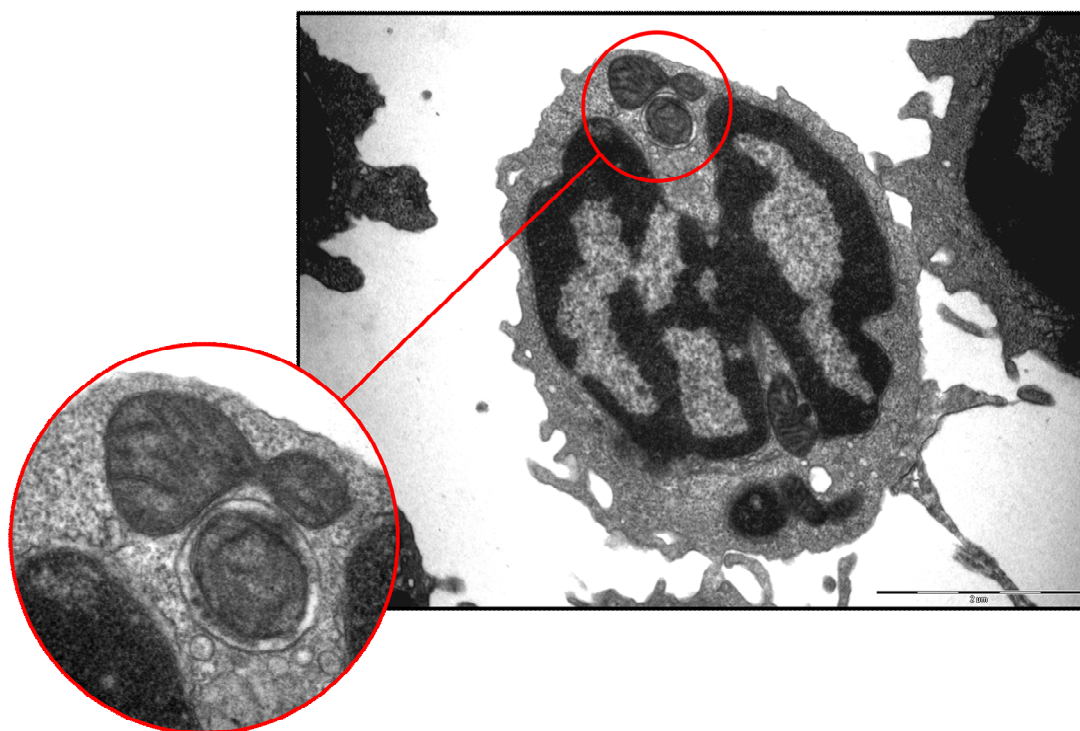
Tabela 4.2.1 Kvantifikacija autofagičnih struktura

	Autofagične strukture	Autofagozomi i fagofore	Autolizozomi	Lipofagi	Mitofagi
Zdrave osobe	25.9 ± 5.4	0.3 ± 0.5	23.9 ± 4.7	1.1 ± 1.9	0.4 ± 0.5
Novootkriven T2DM	62.7 ± 20.8	1.7 ± 1.9	55.3 ± 20.1	1 ± 1.8	1.3 ± 1.3
T2DM lečeni metforminom	88.7 ± 26.5	1.6 ± 1.9	74 ± 30.9	0.9 ± 0.4	1.9 ± 1.7
T2DM lečeni insulinom	49.7 ± 18.2	2.3 ± 2.1	44.7 ± 16.7	2.1 ± 3.2	0.6 ± 0.8



Grafikon 4.2.2 Kvantifikacija autofagičnih struktura i autolizozoma. Na grafikonu je prikazana: statistički visoko značajna razlika između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom u broju autofagičnih struktura (** $p < 0,01$); statistički značajna razlika između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika u broju autolizozoma (# $p < 0,05$) i statistički visoko značajna razlika između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom (## $p < 0,01$)

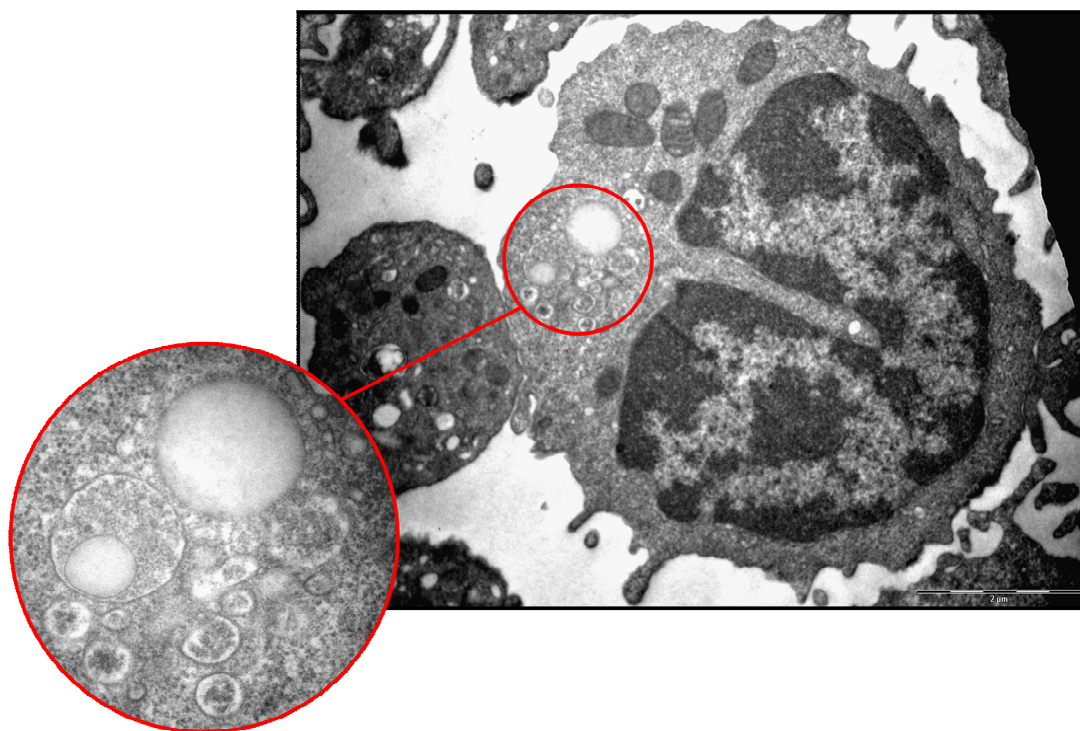
U broju mitofaga i lipofaga nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa, što je i očekivan rezultat s obzirom da su u pitanju strukture koje se teško identifikuju na presecima ćelija zbog degradacije sadržaja autolizozoma. U ćelijama T2DM bolesnika su uočeni autolizozomi sa očuvanim mitohondrijama u lumenu, tzv. mitofagi (Slika 4.2.3)



Slika 4.2.3 Limfocit sa mitofagom. Na uveličanom detalju se vidi očuvana mitohondrija u lumenu autolizozoma. (8900x, detalj 36000x)

Pored očuvanih mitofaga, u limfocitima T2DM bolesnika bili su prisutni i autolizozomi u kojima su se u lumenu videle lipidne kapi, tzv. lipofagi (Slika 4.2.4).

Broj multivezikularnih tela kod zdravih ispitanika bio je $18,43 \pm 8$; kod novootkrivenih T2DM bolesnika $12,86 \pm 10,6$; kod T2DM bolesnika lečenih metforminom $24,43 \pm 7,1$; i kod T2DM bolesnika lečenih insulinom $14,5 \pm 8,9$. Nije nađena statistička značajnost u broju multivezikularnih tela između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika.



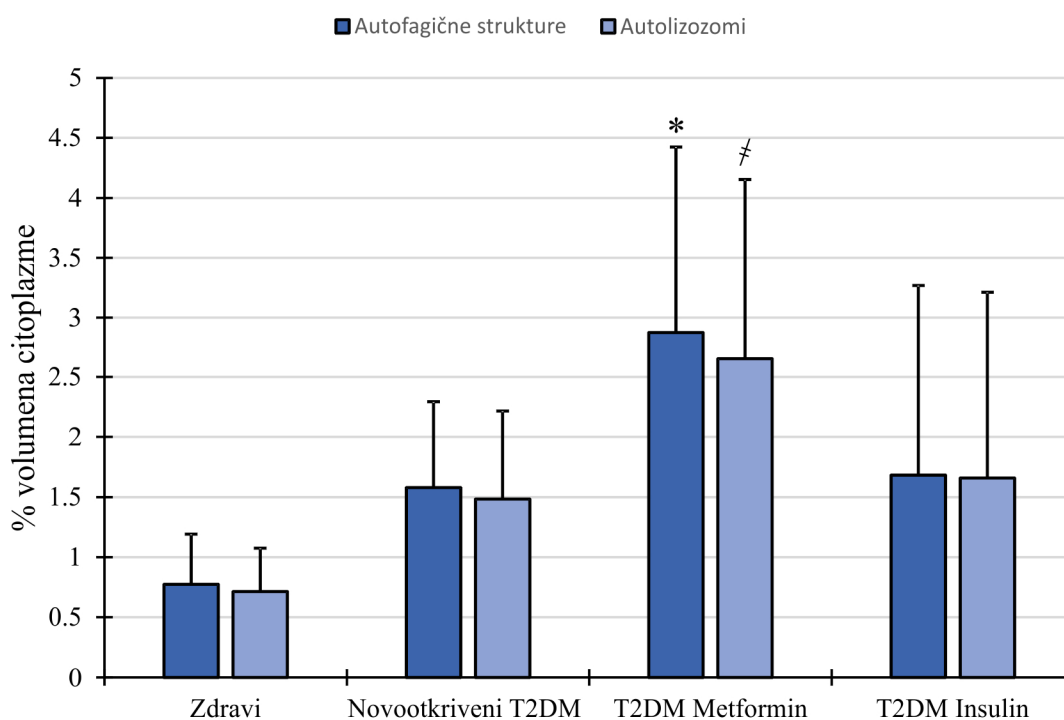
Slika 4.2.4 Limfocit sa lipofagom. Na uveličanom detalju se vidi lipidna kap i autolizozom sa lipidnom kapi u lumenu. (8900x, detalj 36000x)

S obzirom da je broj autofagičnih struktura kvantifikovan na 2D preseku ćelija hteli smo da proverimo ima li razlike i u volumenu autofagičnih struktura u citoplazmi između ispitivanih grupa. Parametri volumetrijske analize dati su u Tabeli 4.2.2.

Tabela 4.2.2 Volumetrijska analiza autofagičnih struktura

	Autofagične strukture	Autofagozomi i fagofore	Auto-lizozomi	Lipofagi	Mitofagi
Zdrave osobe	0.77 ± 0.42	0 ± 0.01	0.71 ± 0.4	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.03
Novootkriven T2DM	1.58 ± 0.72	0.06 ± 0.07	1.48 ± 0.7	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.04
T2DM lečeni metforminom	2.88 ± 1.6	0.04 ± 0.08	2.66 ± 1.5	0.04 ± 0.05	0.14 ± 0.22
T2DM lečeni insulinom	1.7 ± 1.5	0 ± 0	1.66 ± 1.6	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04

Analiza volumena autofagičnih struktura i autolizozoma pokazala je statistički značajnu razliku između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($p < 0,05$) (Grafikon 4.2.3). Između ostalih grupa ispitanika nije bilo statistički značajne razlike. Autofagozomi i fagofore, lipofagi i mitofagi se ne razlikuju u volumenu između ispitivanih grupa.

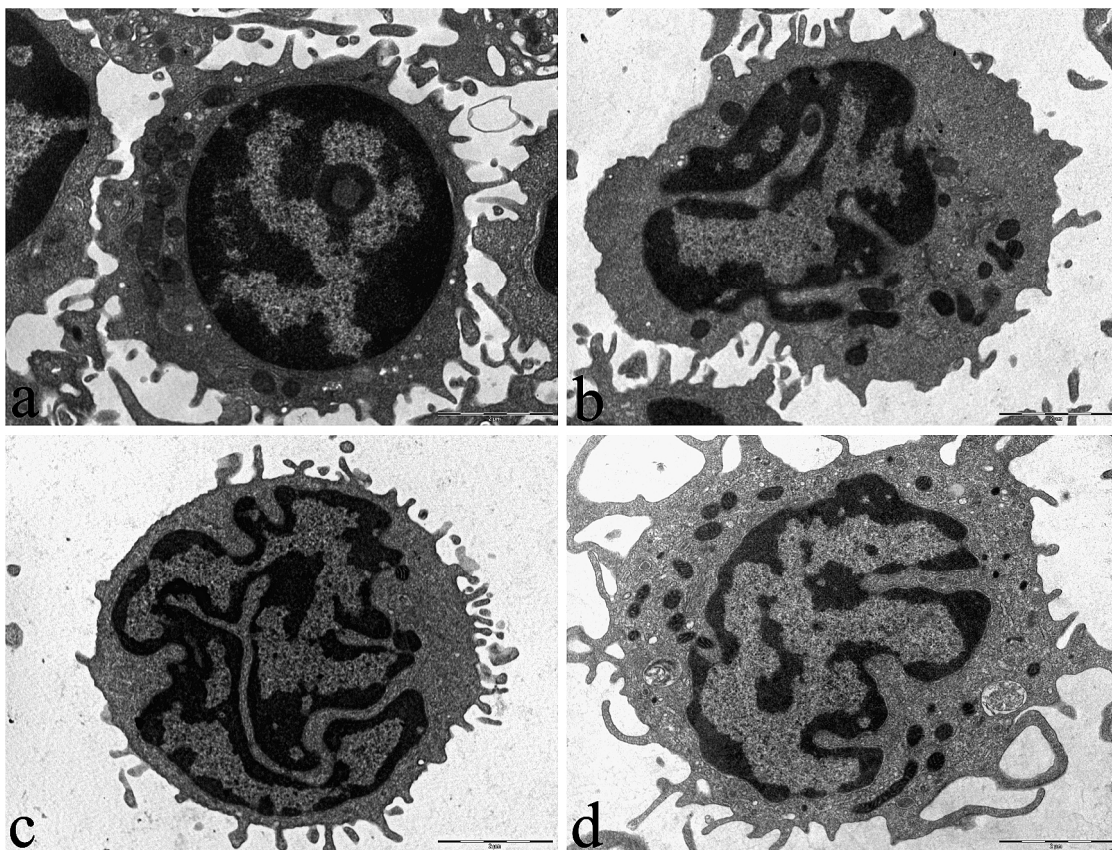


Grafikon 4.2.3 Volumetrijska analiza autofagičnih struktura i autolizozoma. Na grafikonu je prikazana: statistički značajna razlika između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom u volumenu autofagičnih struktura (* $p < 0,05$) i u volumenu autolizozoma (≠ $p < 0,05$)

4.3 Analiza oblika i morfoloških karakteristika nukleusa

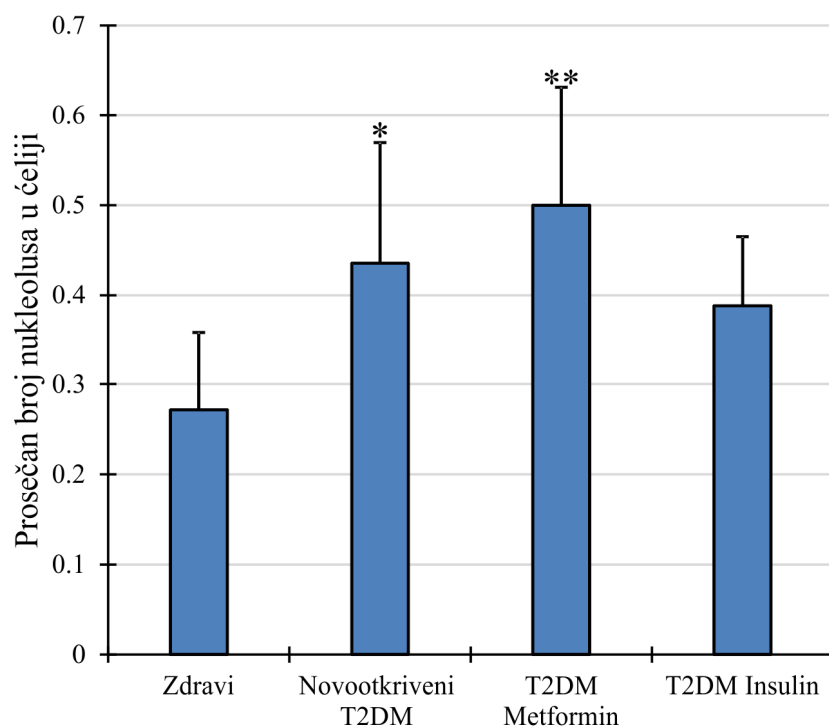
Nukleusi limfocita zdravih ispitanika su bili predominantno heterohromatični i okruglog oblika, sa malim procentom nukleusa sa usekom (Slika 4.3.1a). S druge strane, većina limfocita bolesnika sa T2DM je imala nukleus nepravilnog oblika sa većom količinom euhromatina (Slika 4.3.1b-d). Ova promena oblika nukleusa zapažena je u svim grupama ispitanika sa T2DM bez obzira na primenjenu terapiju. Uočeni su nukleusi

sa dubokim usecima, nukleusi izuvijanog oblika i nukleusi cerebriformnog izgleda (Slika 4.3.1c).



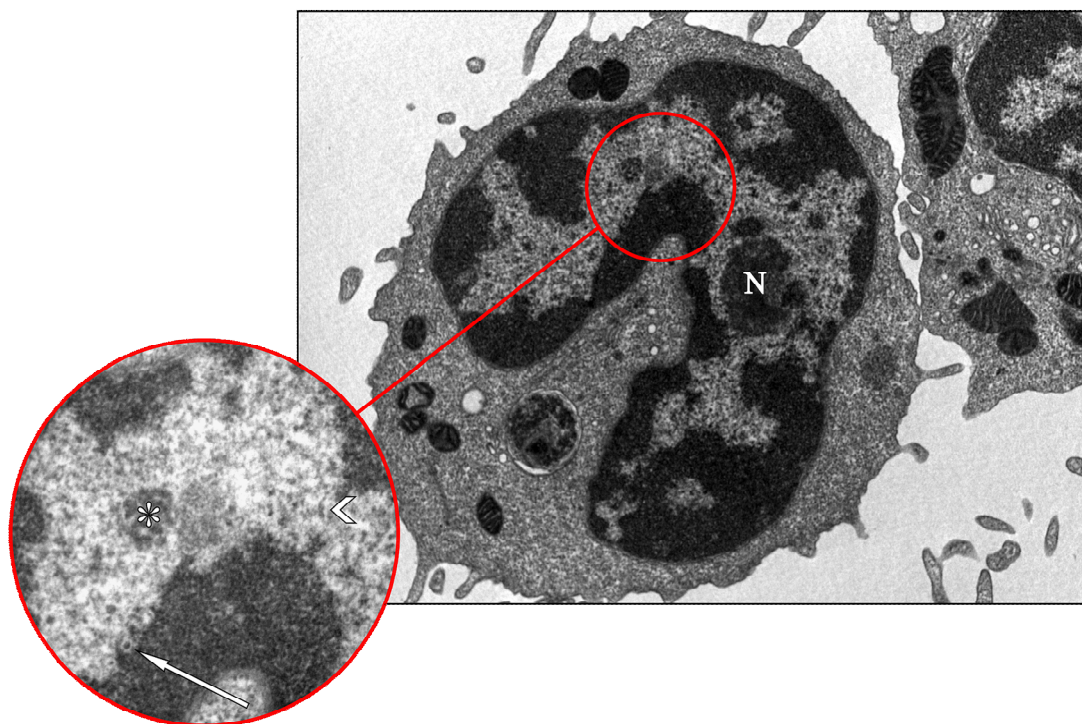
Slika 4.3.1 Oblik nukleusa limfocita zdravih ispitanika (a), novootkrivenih T2DM bolesnika (b), T2DM bolesnika na terapiji metforminom (c) i T2DM bolesnika na terapiji insulinom (d) (uveličanje 8900x)

Dalja analiza morfoloških karakteristika nukleusa pokazala je da novootkriveni T2DM bolesnici ($0,44 \pm 0,13$, $p < 0,05$) i T2DM bolesnici lečeni metforminom ($0,50 \pm 0,13$, $p < 0,01$) imaju statistički značajno veći broj nukleolusa po ćeliji u odnosu na zdrave osobe ($0,27 \pm 0,09$). Nije uočena statistički značajna razlika između T2DM bolesnika lečenih insulinom ($0,39 \pm 0,08$, $p = 0,223$) i zdravih osoba, kao ni između T2DM bolesnika lečenih insulinom i bez terapije, odnosno na terapiji metforminom ($p = 0,850$, $p = 0,255$, respektivno) (Slika 4.3.2; Grafikon 4.3.1).

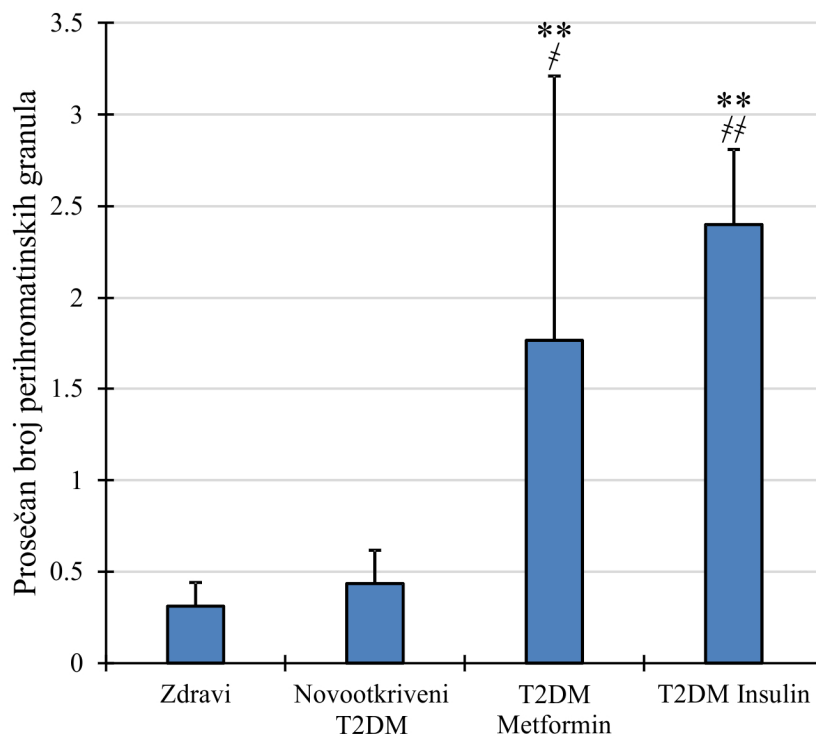


Grafikon 4.3.1 Prosečan broj nukleolusa po ćeliji. Na grafikonu je prikazana statistički značajna razlika između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika (* $p < 0.05$) i statistički visoko značajna razlika između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom (** $p < 0.01$)

Analiza prosečnog broja perihromatinskih granula u nukleusima pokazala je statistički visoko značajno povećanje broja perihromatinskih granula kod T2DM bolesnika lečenih metforminom i insulinom u odnosu na zdrave ispitanike ($1,77 \pm 1,44$; $2,40 \pm 0,41$; $0,31 \pm 0,13$ respektivno, $p < 0,01$). Statistički značajno povećanje je uočeno između novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom i insulinom ($0,44 \pm 0,18$; $1,77 \pm 1,44$, $p < 0,05$; $2,40 \pm 0,41$, $p < 0,01$ respektivno) (Slika 4.3.2; Grafikon 4.3.2). Između novootkrivenih T2DM bolesnika i zdravih ispitanika nije uočena razlika u prosečnom broju perihromatinskih granula po ćeliji ($p = 0,990$).

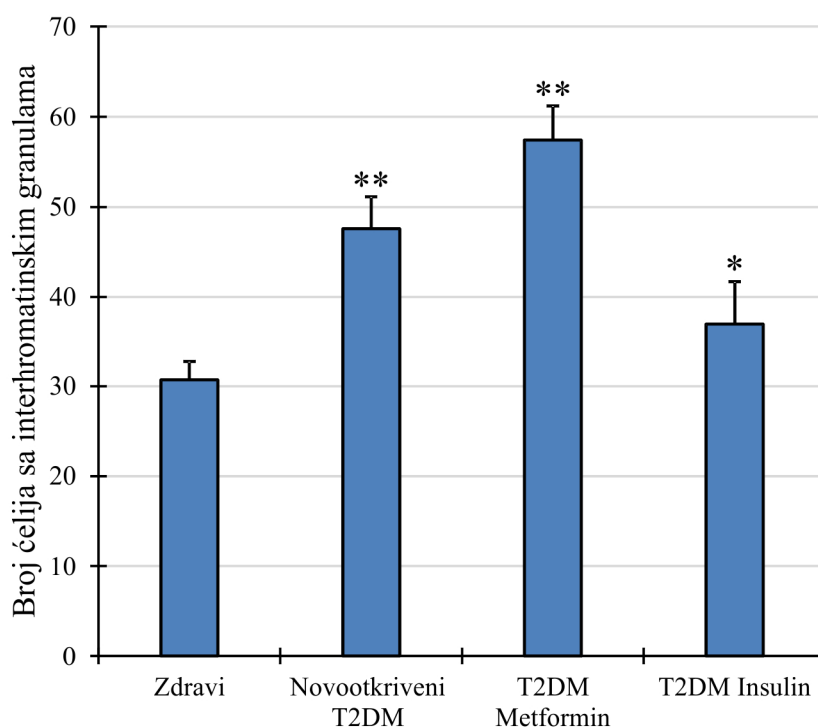


Slika 4.3.2 Kvantifikovane nuklearne strukture: nukleolus (N), perihromatinske granule (bela strelica), interhromatinske granule (beli vrh strelice) i Cajal-ova tela (zvezdica)



Grafikon 4.3.2 Prosečan broj perihromatinskih granula po nukleusu. Na grafikonu je prikazana: statistički visoko značajna razlika između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ili insulinom (** $p < 0.01$); statistički značajna razlika između novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM lečenih metforminom ($\neq p < 0.05$) i statistički visoko značajna razlika između novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM lečenih insulinom ($\# p < 0.01$)

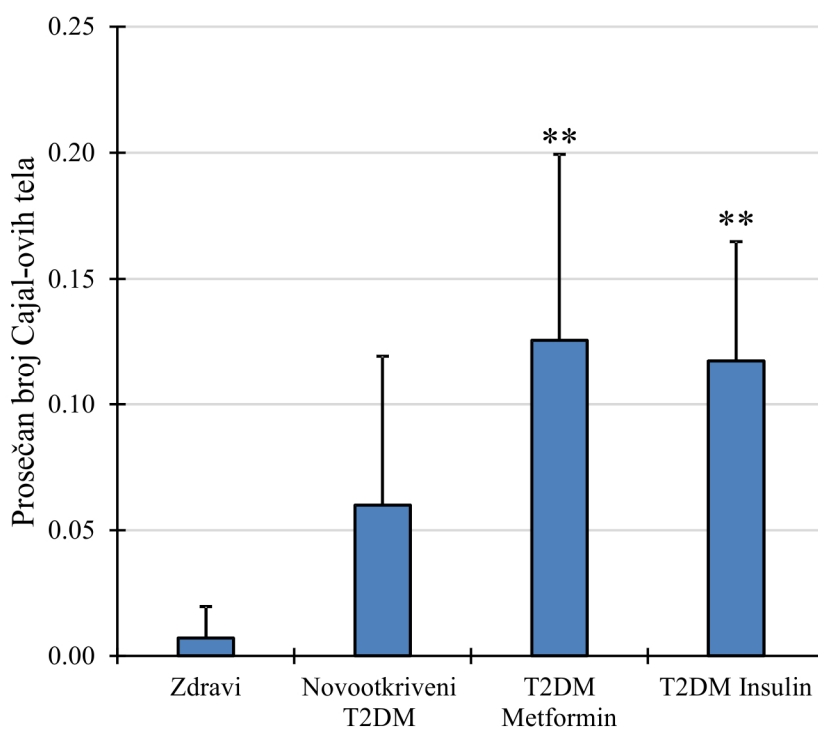
Kvantifikacija broja ćelija sa prisutnim interhromatinskim granulama na ispitivanim presecima nukleusa pokazala je statistički visoko značajnu razliku između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($30,71 \pm 2,14$; $47,57 \pm 3,55$; $57,43 \pm 3,78$ respektivno, $p < 0,01$) i statistički značajnu razliku između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih insulinom ($30,71 \pm 2,14$; $37 \pm 4,73$ respektivno, $p < 0,05$) (Slika 4.3.2; Grafikon 4.3.3). Između svih ispitivanih grupa T2DM bolesnika je uočena statistički visoko značajna razlika u broju ćelija sa prisutnim interhromatinskim granulama na preseku nukleusa ($p < 0,01$).



Grafikon 4.3.3 Broj ćelija sa prisutnim interhromatinskim granulama. Na grafikonu je prikazana: statistički visoko značajna razlika između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM lečenih metforminom (** $p < 0,01$); statistički značajna razlika između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih insulinom (* $p < 0,05$)

Prosečan broj Cajal-ovih tela po nukleusu se statistički visoko značajno razlikovao između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom i insulinom ($0,01 \pm 0,01$; $0,13 \pm 0,07$; $0,12 \pm 0,05$ respektivno, $p < 0,01$) (Slika 4.3.2; Grafikon 4.3.4). Između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika nije uočena razlika u prosečnom

broju Cajal-ovih tela po nukleusu ($0,01 \pm 0,01$; $0,06 \pm 0,06$ respektivno, $p = 0,270$), kao ni između novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($p = 0,123$) ili insulinom ($p = 0,211$). Nema statistički značajne razlike u prosečnom broju Cajal-ovih tela između T2DM bolesnika lečenih metforminom i T2DM bolesnika lečenih insulinom ($p = 0,990$).



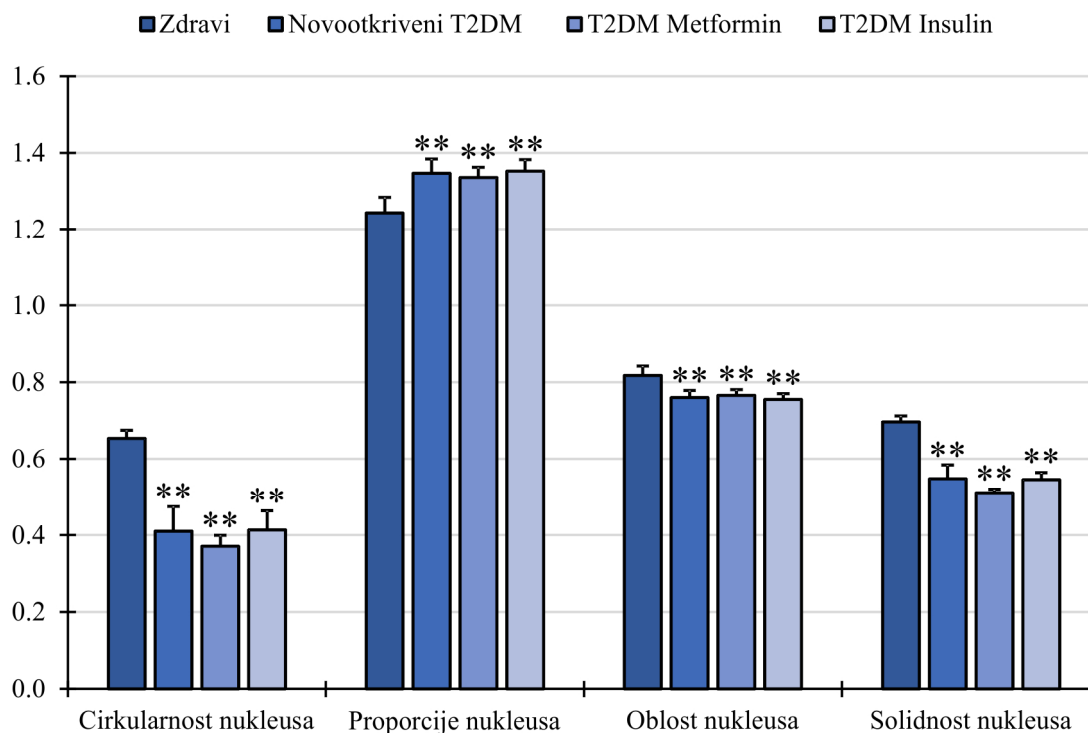
Grafikon 4.3.4 Prosečan broj Cajal-ovih tela po nukleusu. Na grafikonu je prikazana statistički visoko značajna razlika između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ili insulinom (** $p < 0.01$)

U analizi oblika nukleusa izračunati su parametri oblika nukleusa: cirkularnost, oblost, solidnost i proporcije nukleusa pomoću *ImageJ* programa. Njihove srednje vrednosti date su u Tabeli 4.3.

Tabela 4.3 Srednje vrednosti parametara oblika nukleusa

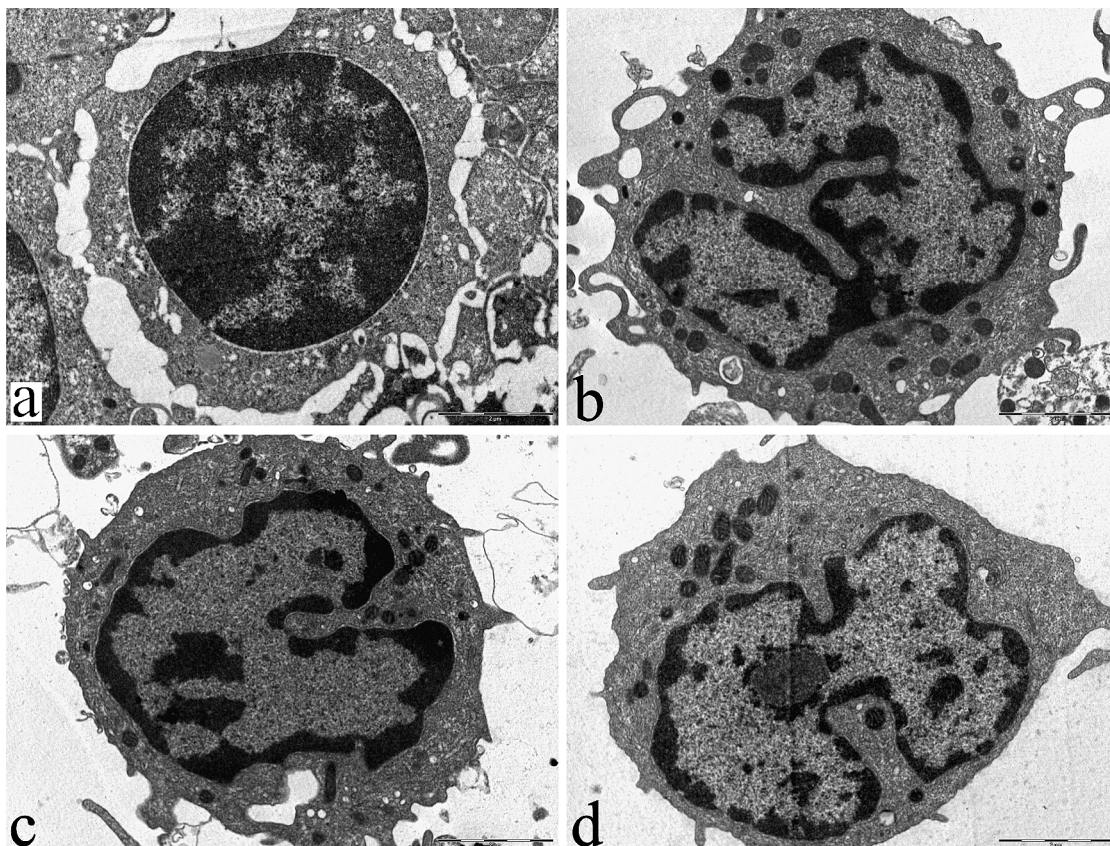
	Cirkularnost nukleusa	Proporcije nukleusa	Oblost nukleusa	Solidnost nukleusa
Zdrave osobe	0.65 ± 0.02	1.24 ± 0.04	0.82 ± 0.02	0.70 ± 0.02
Novootkriveni T2DM	0.41 ± 0.06	1.35 ± 0.04	0.76 ± 0.02	0.55 ± 0.04
T2DM lečeni metforminom	0.37 ± 0.03	1.34 ± 0.03	0.77 ± 0.02	0.51 ± 0.01
T2DM lečeni insulinom	0.41 ± 0.05	1.35 ± 0.03	0.75 ± 0.02	0.55 ± 0.02

ANOVA analiza je pokazala statistički visoko značajno smanjenje cirkularnosti, oblosti i solidnosti nukleusa kod svih ispitivanih grupa T2DM bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$) i statistički visoko značajno povećanje proporcije nukleusa kod svih ispitivanih grupa T2DM bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$) (Grafikon 4.3.5). Nije uočena statistički značajna razlika u ispitivanim parametrima oblika nukleusa između različitih ispitivanih grupa T2DM bolesnika.

**Grafikon 4.3.5** Poređenje parametara oblika nukleusa. ** $p < 0.01$

4.4 Analiza površine heterohromatina

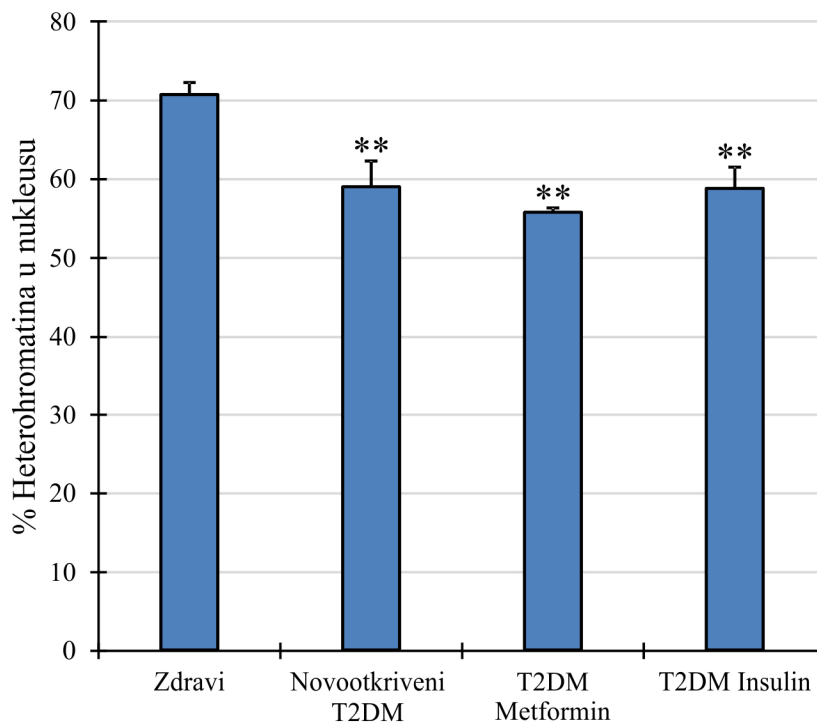
Pregledom slika limfocita sa TEM-a primećeno je da su nukleusi limfocita bolesnika sa T2DM euhromatični (Slika 4.4b-d) u odnosu na heterohromatične nukleuse zdravih ispitanika (Slika 4.4a).



Slika 4.4 Distribucija hromatina u nukleusima limfocita zdravih ispitanika (a), novootkrivenih T2DM bolesnika (b), T2DM bolesnika na terapiji metforminom (c) i T2DM bolesnika na terapiji insulinom (d) (uveličanje 8900x)

Merenjem površine heterohromatina u nukleusima limfocita utvrđeno je da u nukleusima limfocita zdravih osoba dominira heterohromatin ($70,63\% \pm 1,6$), dok se kod T2DM bolesnika površina heterohromatina smanjuje: kod novootkrivenih T2DM bolesnika na $58,95\% \pm 3,35$, kod bolesnika na terapiji metforminom na $55,70\% \pm 0,67$ i kod bolesnika na terapiji insulinom na $58,76\% \pm 2,79$. Ovo smanjenje površine heterohromatina kod T2DM bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike je statistički visoko značajno ($p < 0.01$) (Grafikon 4.4). ANOVA analiza je pokazala da ne postoji statistički

značajna razlika u površini heterohromatina između novootkrivenih T2DM bolesnika i lečenih T2DM bolesnika bez obzira na primenjenu terapiju.



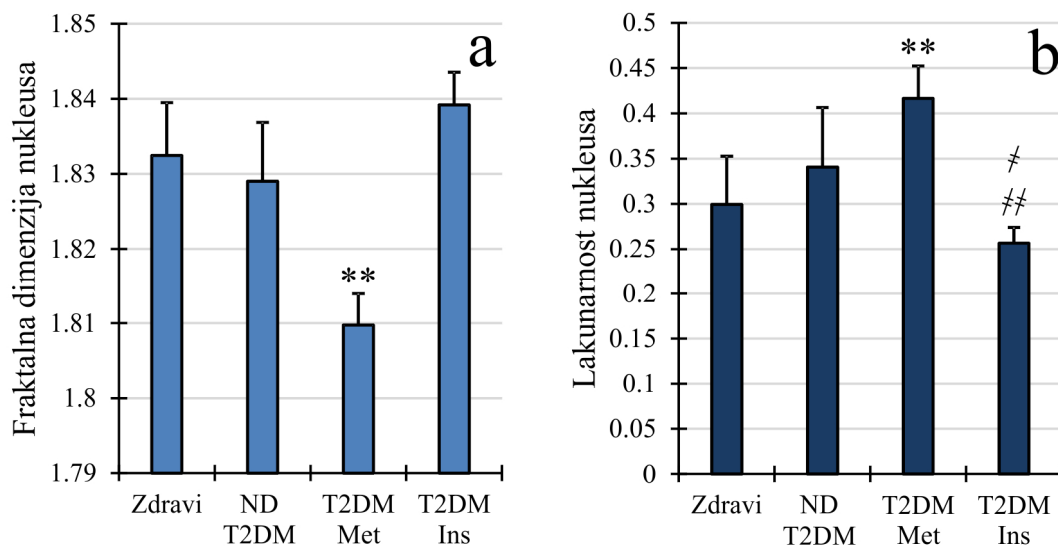
Grafikon 4.4 Procenat površine heterohromatina u nukleusima ispitanika. ** $p < 0.01$

4.5 Fraktalna analiza nukleusa i citoplazme

4.5.1 Fraktalna analiza nukleusa

Analiza fraktalne dimenzije nukleusa pokazala je da postoji statistički visoko značajno smanjenje fraktalne dimenzije kod T2DM bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike (1.809776 ± 0.004186 ; 1.832484 ± 0.007014 respektivno, $p < 0,01$), u odnosu na novootkrivene T2DM bolesnike (1.809776 ± 0.004186 ; 1.829022 ± 0.007857 respektivno, $p < 0,01$) i u odnosu na T2DM bolesnike lečene insulinom (1.809776 ± 0.004186 ; 1.839199 ± 0.004349 respektivno, $p < 0,01$) (Grafikon 4.5.1a).

Između zdravih ispitanika, novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih insulinom nema statistički značajne razlike u fraktalnoj dimenziji.

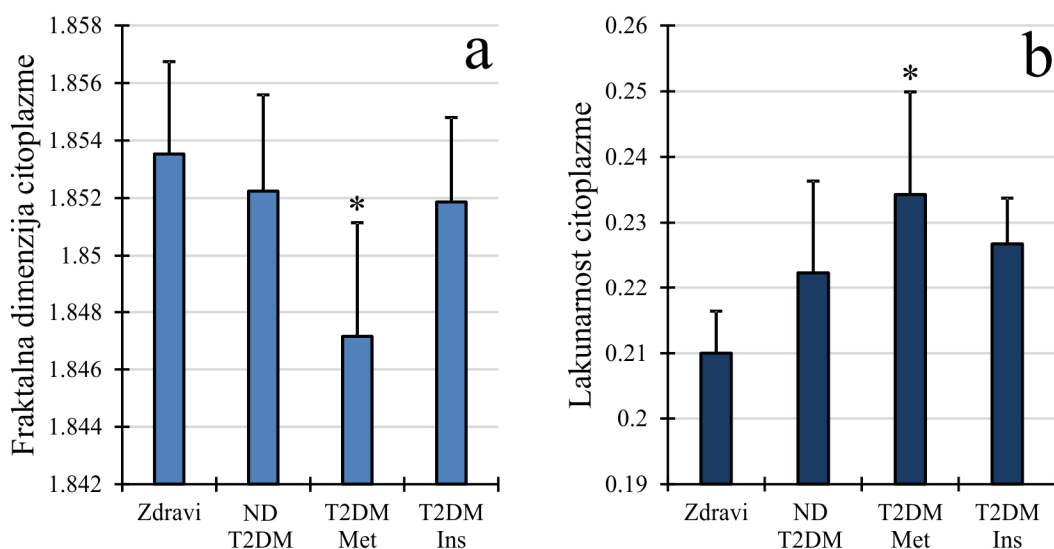


Grafikon 4.5.1 Fraktalna analiza nukleusa. Analiza fraktalne dimenzije (a) i lakunarnosti nukleusa (b) pokazuje statistički značajnu razliku između zdravih ispitanika (Zdravi) i T2DM bolesnika lečenih metforminom (T2DM Met), ** $p < 0,01$. Pad lakunarnosti kod T2DM bolesnika lečenih insulinom (T2DM Ins) je statistički visoko značajan u odnosu na T2DM bolesnike lečene metforminom (## $p < 0,01$) i statistički značajan u odnosu na novootkrivene T2DM bolesnike (ND T2DM) (# $p < 0,05$)

Porast lakunarnosti nukleusa je bio statistički visoko značajan kod T2DM bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike (0.416393 ± 0.035700 ; 0.299509 ± 0.052975 respektivno, $p < 0,01$) (Grafikon 4.5.1b). Iako postoji porast lakunarnosti nukleusa nema statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika (0.299509 ± 0.052975 ; 0.340676 ± 0.065508 respektivno). Pad vrednosti lakunarnosti kod T2DM bolesnika lečenih insulinom u odnosu na T2DM bolesnike lečene metforminom (0.256504 ± 0.017350 ; 0.416393 ± 0.035700 respektivno, $p < 0,01$) je statistički visoko značajan, a u odnosu na novootkrivene T2DM bolesnike (0.256504 ± 0.017350 ; 0.340676 ± 0.065508 respektivno, $p < 0,05$) statistički značajan. Između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih insulinom (0.299509 ± 0.052975 ; 0.256504 ± 0.017350 respektivno) nema statistički značajne razlike u lakunarnosti nukleusa.

4.5.2 Fraktalna analiza citoplazme

Analiza fraktalne dimenzije citoplazme kao mere nivoa kompleksnosti analizirane strukture pokazala je da postoji statistički značajno smanjenje fraktalne dimenzije kod T2DM bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike ($1,847163 \pm 0,003979$; $1,853537 \pm 0,00321$ respektivno, $p < 0,05$) (Grafikon 4.5.2a). Između zdravih ispitanika, novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih insulinom ($1,853537 \pm 0,00321$; $1,852249 \pm 0,003338$, $p = 0,921$; $1,851864 \pm 0,002941$, $p = 0,845$ respektivno) nije nađena statistički značajna razlika.



Grafikon 4.5.2 Fraktalna analiza citoplazme. Analiza fraktalne dimenzije (a) i lakunarnosti citoplazme (b) pokazuje statistički značajnu razliku između zdravih ispitanika (Zdravi) i T2DM bolesnika lečenih metforminom (T2DM Met), * $p < 0,05$. Novootkriveni T2DM bolesnici (ND T2DM), T2DM bolesnici lečenih insulinom (T2DM Ins)

Lakunarnost citoplazme se statistički značajno razlikovala između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($0,209973 \pm 0,006418$; $0,234258 \pm 0,015619$ respektivno, $p < 0,05$) (Grafikon 4.5.2b). Između zdravih ispitanika, novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih insulinom ($0,209973 \pm 0,006418$; $0,222366 \pm 0,013972$, $p = 0,299$; $0,2268 \pm 0,006945$, $p = 0,102$ respektivno) nije nađena statistički značajna razlika.

4.6 Teksturalna analiza nukleusa i citoplazme

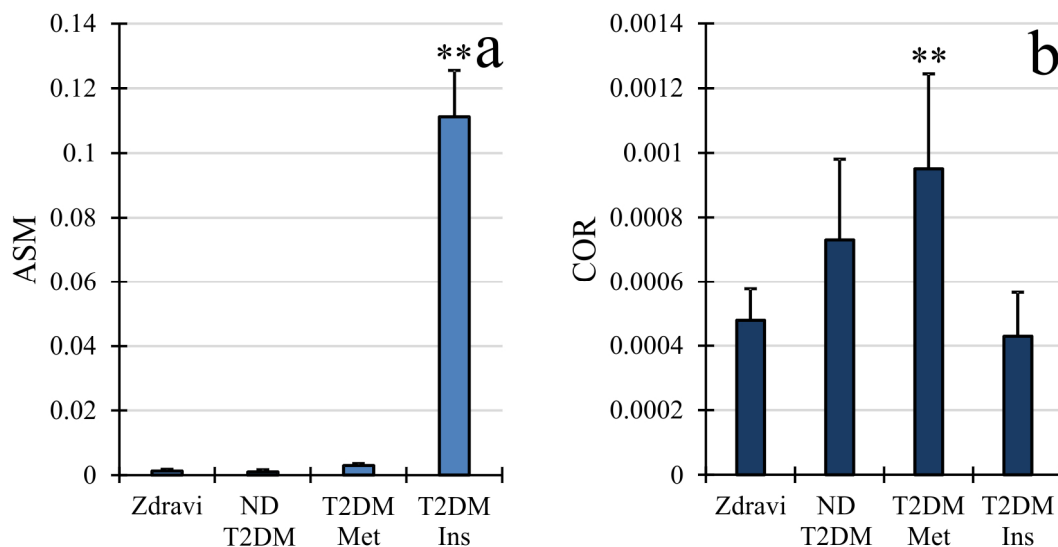
4.6.1 Teksturalna analiza nukleusa

Teksturalna analiza polja hromatina u nukleusu urađena je na kropovima nukleusa limfocita u *ImageJ* programu. U svim ispitivanim grupama računane su srednje vrednosti parametara GLCM analize: angularnog drugog momenta (ASM), teksturalnog kontrasta (CON), inverznog momenta razlike (IDM), teksturalne korelacije (COR) i varijanse teksturalnog matriksa (VAR). Njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 4.6.1.

Tabela 4.6.1 Parametri teksturalne analize nukleusa

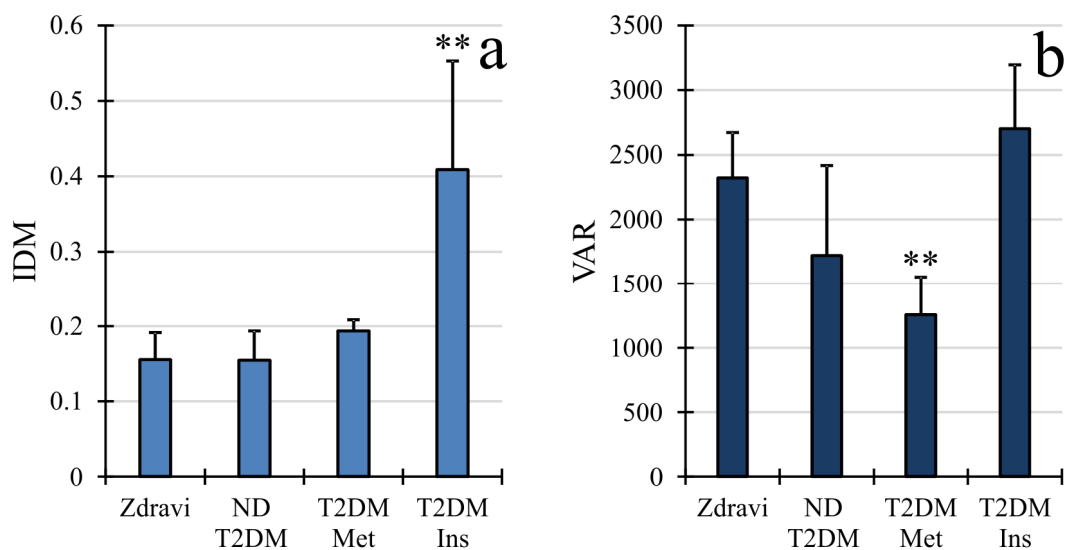
	ASM	CON	IDM	COR	VAR
Zdrave osobe	0.00121 ± 0.00055	117.27 ± 57.21	0.156 ± 0.036	0.00048 ± 0.00001	2322.04 ± 349.45
Novootkriveni T2DM	0.00099 ± 0.00066	99.55 ± 45.23	0.155 ± 0.039	0.00073 ± 0.00025	1720.97 ± 696.32
T2DM lečeni metforminom	0.00292 ± 0.00061	66.40 ± 20.34	0.194 ± 0.023	0.00095 ± 0.00029	1254.95 ± 357.79
T2DM lečeni insulinom	0.11128 ± 0.01427	112.74 ± 33.29	0.409 ± 0.144	0.00043 ± 0.00014	2701.89 ± 493.02

Analiza ASM pokazala je statistički visoko značajnu razliku između T2DM bolesnika lečenih insulinom i zdravih ispitanika, novootkrivenih T2DM bolesnika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($p < 0,01$) (Grafikon 4.6.1.1a). Dalja analiza GLCM parametara pokazala je porast COR koji je visoko statistički značajan između zdravih ispitanika i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($p < 0,01$) i između T2DM bolesnika lečenih insulinom i T2DM bolesnika lečenih metforminom ($p < 0,01$) (Grafikon 4.6.1.1b).



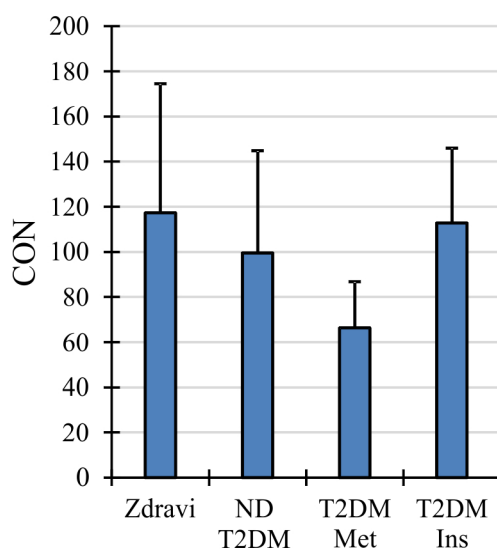
Grafikon 4.6.1.1 Parametri teksturalne analize: angularni drugi moment (a) i teksturalna korelacija (b). Statistički visoko značajan porast vrednosti ASM između T2DM bolesnika lečenih insulinom (T2DM Ins) i zdravih ispitanika (Zdravi), novootkrivenih T2DM bolesnika (ND T2DM) i T2DM bolesnika lečenih metforminom (T2DM Met) (** p < 0,01). Porast COR kod T2DM bolesnika lečenih metforminom je statistički visoko značajan u odnosu na zdrave ispitanike i T2DM bolesnike lečene insulinom (**p < 0,01)

Porast vrednosti inverznog momenta razlike (IDM) kod T2DM bolesnika lečenih insulinom je visoko statistički značajan u odnosu na zdrave ispitanike, novootkrivene T2DM bolesnike i T2DM bolesnike lečene metforminom ($p < 0,01$) (Grafikon 4.6.1.2a). Pad varijanse teksturalnog matriksa (VAR) kod T2DM bolesnika lečenih metforminom je statistički visoko značajan u odnosu na T2DM bolesnike lečene insulinom ($p < 0,01$) (Grafikon 4.6.1.2b).



Grafikon 4.6.1.2 Parametri teksturalne analize: inverzni moment razlike (a) i teksturalna varijansa (b). Statistički visoko značajan porast vrednosti IDM kod T2DM bolesnika lečenih insulinom (T2DM Ins) u odnosu na zdrave ispitanike (Zdravi), novootkrivene T2DM bolesnike (ND T2DM) i T2DM bolesnike lečene metforminom (T2DM Met) (** $p < 0,01$). Pad VAR kod T2DM bolesnika lečenih metforminom je statistički visoko značajan u odnosu na T2DM bolesnike lečene insulinom (** $p < 0,01$)

U teksturalnom kontrastu nije nađena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa (Grafikon 4.6.1.3).



Grafikon 4.6.1.3 Teksturalni kontrast (GLCM CON). Nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Zdravi ispitanici (Zdravi), novootkriveni T2DM bolesnici (ND T2DM), T2DM bolesnici lečeni metforminom (T2DM Met), T2DM bolesnici lečeni insulinom (T2DM Ins)

4.6.2 Teksturalna analiza citoplazme

Teksturalna analiza je urađena i na kropovima citoplazme limfocita svih ispitivanih grupa. Srednje vrednosti parametara GLCM analize: angularnog drugog momenta (ASM), teksturalnog kontrasta (CON), inverznog momenta razlike (IDM), teksturalne korelacije (COR) i varijanse teksturalnog matriksa (VAR) su prikazane u Tabeli 4.6.2. Nema statistički značajne razlike u ispitivanim parametrima GLCM analize između ispitivanih grupa.

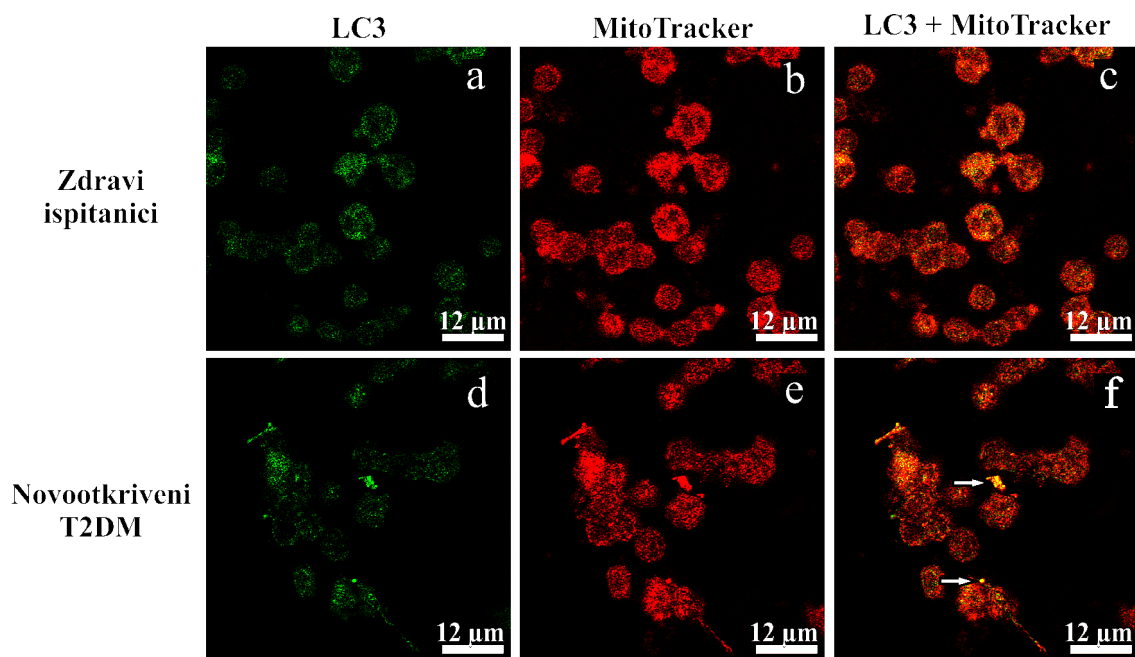
Tabela 4.6.2 Parametri teksturalne analize citoplazme

	ASM	CON	IDM	COR	VAR
Zdrave osobe	0.458 ± 0.024	81.06 ± 29.39	0.709 ± 0.021	0.00038 ± 7.8x10 ⁻⁵	3141.87 ± 620.82
Novootkriveni T2DM	0.429 ± 0.047	85.35 ± 27.35	0.693 ± 0.03	0.00042 ± 0.0002	2921.2 ± 1195.63
T2DM lečeni metforminom	0.454 ± 0.016	73.27 ± 12.29	0.714 ± 0.014	0.00049 ± 9.5x10 ⁻⁵	2291.81 ± 476.13
T2DM lečeni insulinom	0.451 ± 0.032	108.55 ± 19.12	0.700 ± 0.023	0.00035 ± 6.1x10 ⁻⁵	3103.41 ± 556.38

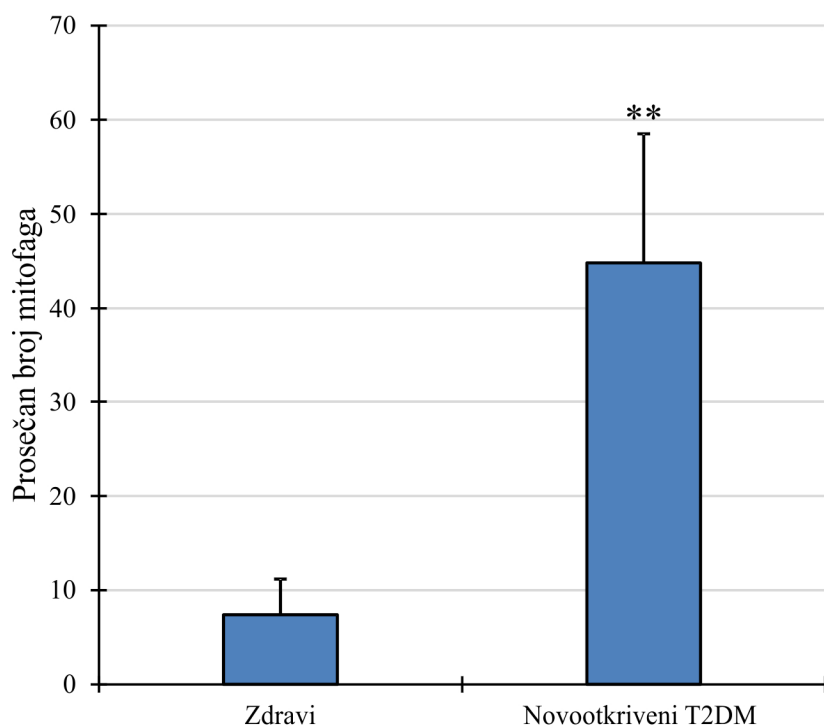
4.7 Procena autofagije na konfokalnom mikroskopu

S obzirom da je na TEM-u uočeno statistički visoko značajno povećanje broja autolizozoma kod novootkrivenih T2DM bolesnika u odnosu na zdrave osobe, a da se autofagične strukture, pogotovo mitofagi, relativno retko viđaju na ćelijskim presecima, uradili smo procenu autofagije na konfokalnom mikroskopu pomoću anti-LC3B antitela, MitoTracker-a i LysoTracker-a.

Na slikama dobijenim na konfokalnom mikroskopu utvrđen je statistički visoko značajno veći broj kolokalizovanih punkta (žuti signal) LC3B i mitohondrija kod novootkrivenih T2DM bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (269 ± 45; 37 ± 7 respektivno, p < 0,01) (Slika 4.7.1, Grafikon 4.7.1).

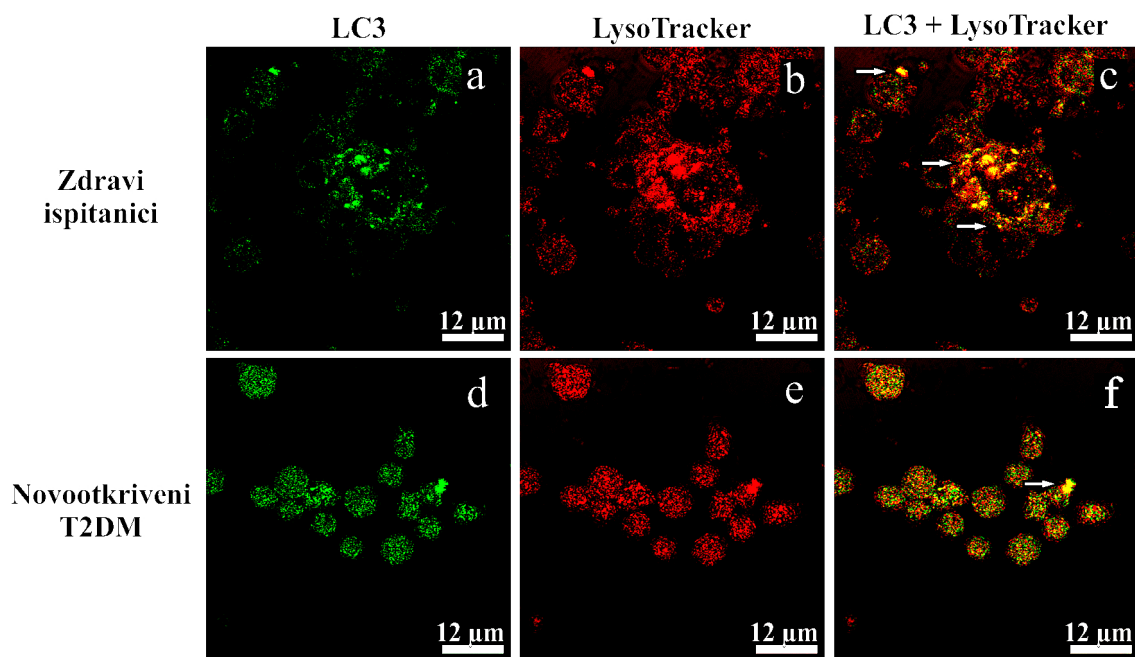


Slika 4.7.1 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa LC3 (zeleno) i MitoTracker (crveno) obojenih ćelija. Bele strelice označavaju kolokalizaciju. (x252)

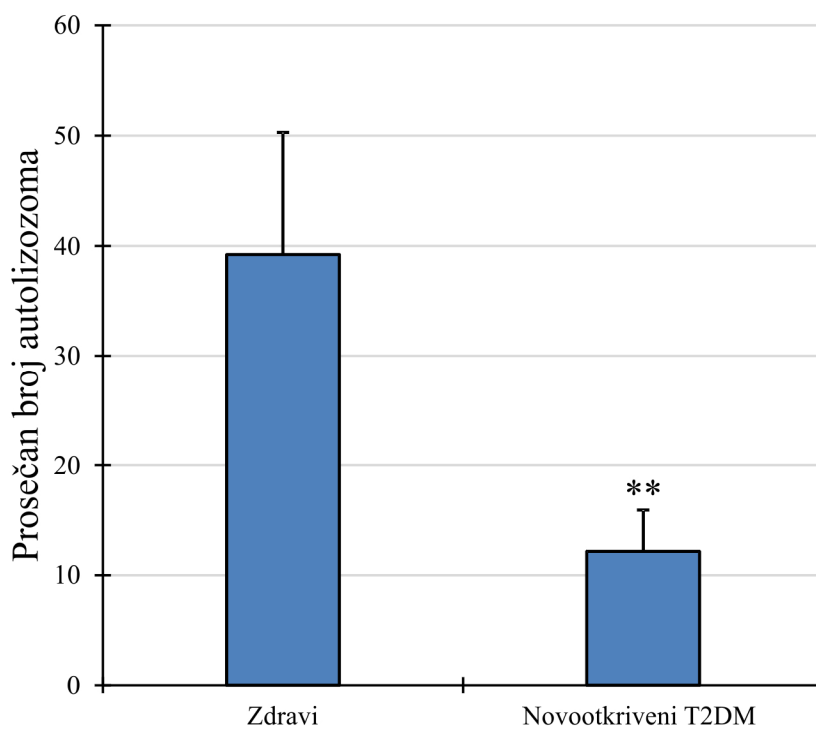


Grafikon 4.7.1 Prosečan broj kolokalizovanih punkta LC3B i mitohondrija. ** p < 0,01

S druge strane, utvrđen je statistički visoko značajno veći broj kolokalizovanih punkta (žuti signal) LC3B i lizozoma kod zdravih ispitanika u odnosu na novootkrivene T2DM bolesnike (39 ± 11 ; 12 ± 3.7 respektivno, $p < 0,01$) (Slika 4.7.2, Grafikon 4.7.2).



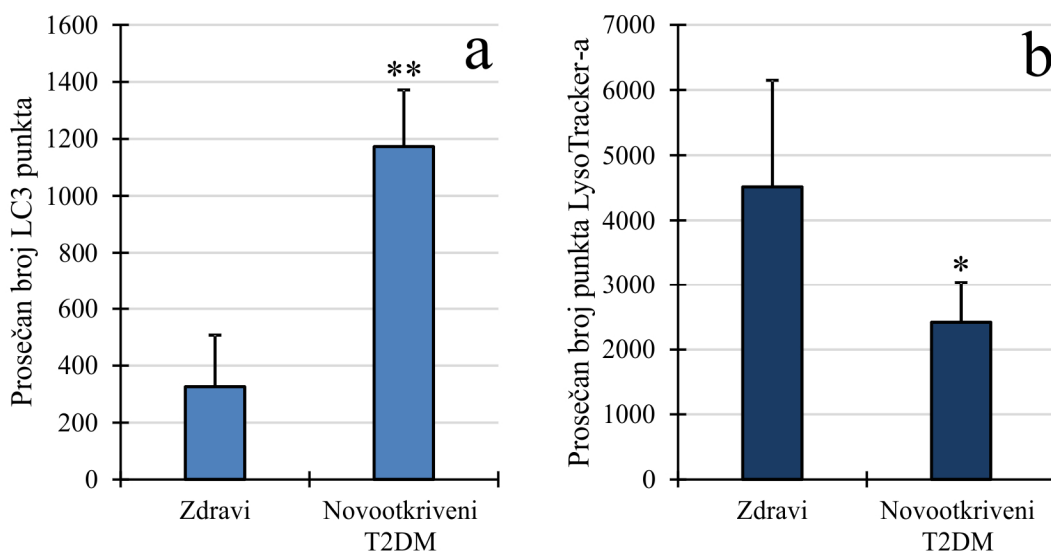
Slika 4.7.2 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa LC3 (zeleno) i LysoTracker (crveno) obojenih ćelija. Bele strelice označavaju kolokalizaciju. (x252)



Grafikon 4.7.2 Prosečan broj kolokalizovanih punkta LC3B i lizozoma. ** p < 0,01

Zbog ovako oprečnih rezultata, urađena je i kvantifikacija LC3 punkta (zeleni signal) koja je pokazala statistički visoko značajno veći broj autofagičnih struktura kod

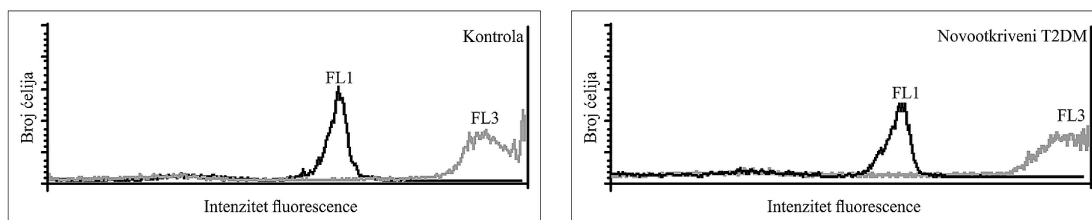
novootkrivenih T2DM bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($1172.7 \pm 199,24$; $326 \pm 181,61$ respektivno, $p < 0,01$) (Grafikon 4.7.3a) i kvantifikacija LysoTracker punkta (crveni signal) koja je pokazala statistički značajno veći broj lizozoma kod zdravih ispitanika u odnosu na novootkrivene T2DM bolesnike ($4512,4 \pm 1638,7$; $2418,8 \pm 623,78$ respektivno, $p < 0,05$) (Grafikon 4.7.3b).



Grafikon 4.7.3 Kvantifikacija LC3 (a) i LysoTracker (b) punkta. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

4.8 Kvantifikacija kiselih vezikula primenom protočne citofluorimetrije

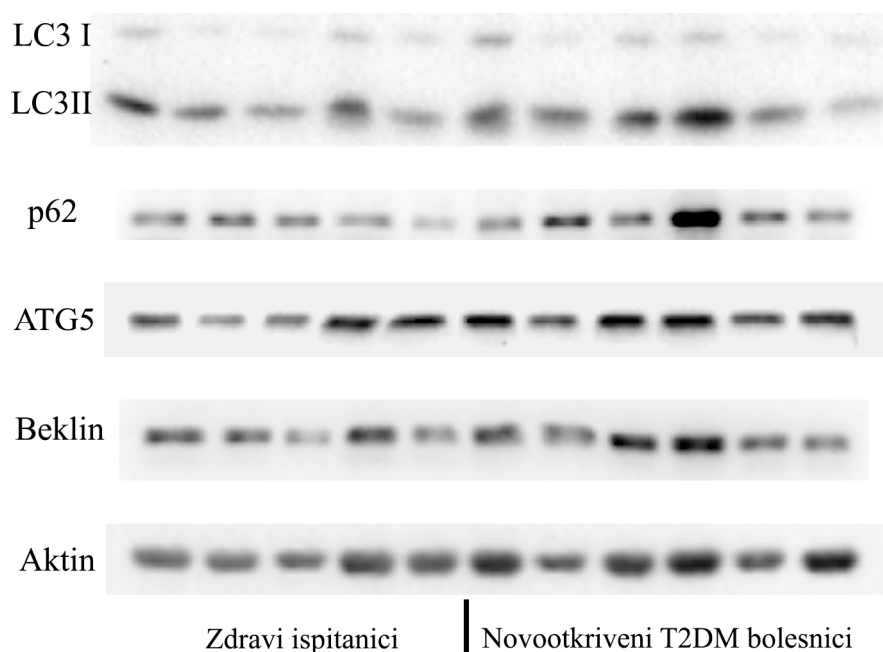
Analiza limfocita obojenih akridin oranžom na protočnom citofluorimetru nije pokazala porast broja kiselih vezikula kod bolesnika sa novootkrivenim T2DM ($17,17$) u odnosu na zdrave ispitanike ($16,69$, $p = 0,9$) (Slika 4.8).



Slika 4.8 Prisustvo kiselih vezikula u akridin oranž obojenim ćelijama. Nema razlike između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika

4.9 Imunoblot analiza

Količine LC3B, p62, ATG5 i beklina kod zdravih ispitanika bile su $1,09 \pm 0,37$; $1,05 \pm 0,38$; $0,26 \pm 0,1$; $0,62 \pm 0,2$ respektivno, a kod novootkrivenih T2DM bolesnika su iznosile $1,16 \pm 0,43$; $1,01 \pm 0,28$; $0,4 \pm 0,3$; $0,58 \pm 0,33$ respektivno. T test nije pokazao statistički značajnu razliku u nivoima ispitivanih proteina između dve grupe ispitanika.



Slika 4.9 Imunoblot analiza proteina karakterističnih za autofagiju. Konverzija LC3 proteina i nivoi p62 proteina, ATG5 i beklina u limfocitima zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika. Kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima korišćena je ekspresija aktina.

4.10 Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije

Srednje vrednosti nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije date su Tabeli 4.10. T test je pokazao statistički značajnu razliku između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika u nivou ekspresije ATG4b ($p < 0,05$). U nivou ekspresije drugih ispitivanih gena nije bilo statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i novootkrivenih T2DM bolesnika.

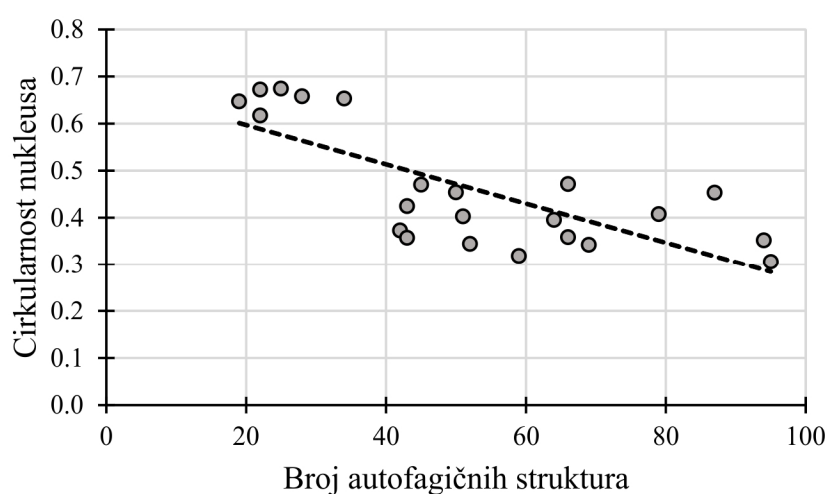
Tabela 4.10 Vrednosti ekspresije gena uključenih u proces autofagije.

	Zdrave osobe	Novootkriveni T2DM
ATG3	3.81 ± 3.26	1,02 ± 0,70
ATG4b	0.0040 ± 0.0016	0.0177 ± 0.0041*
ATG7	2.72 ± 3.63	0.85 ± 0.71
ATG10	0.0025 ± 0	0.0029 ± 0.0017
ATG13	9.09 ± 12.03	1.84 ± 0.77
ATG14	1.18 ± 0.84	0.84 ± 0.75
ATF4	17.76 ± 13.93	13.76 ± 5.50
BCL2	0.61 ± 0.69	0.46 ± 0.36
ULK1	1.19 ± 1.90	0.32 ± 0.22
FOXO1	0.19 ± 0.24	0.20 ± 0.15
FOXO3	0.06 ± 0.06	0.06 ± 0.03
AMBRA	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02
Vps34	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.08
BECN	0.0040 ± 0.0006	0.0065 ± 0.0024
Fip200	2.31 ± 3.60	0.73 ± 0.44
UVRAG	3.54 ± 4.88	1.11 ± 0.79
GABARAP	25.12 ± 37.02	4.52 ± 3.25
RUBICON	0.04 ± 0.03	1.12 ± 2.18
SQSTM1	35.44 ± 26.96	12.86 ± 6.23

* $p < 0,05$

4.11 Korelacija morfometrijske analize autofagičnih struktura i parametara oblika nukleusa

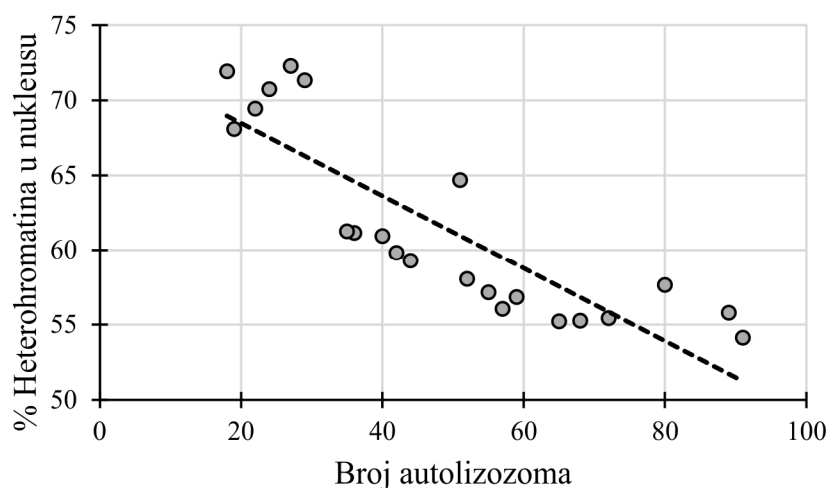
Ukupan broj autofagičnih struktura i autolizozoma negativno korelira sa parametrima oblika nukleusa: cirkularnošću ($r = -0,75$; $r = -0,76$ respektivno, $p < 0,01$) (Grafikon 4.11.1); oblašću nukleusa ($r = -0,75$; $r = -0,73$ respektivno, $p < 0,01$) i sa solidnošću nukleusa ($r = -0,84$; $r = -0,84$ respektivno, $p < 0,01$). Cirkularnost nukleusa negativno korelira i sa volumenom autolizozoma ($r = -0,51$, $p < 0,05$).



Grafikon 4.11.1 Korelacija broja autofagičnih struktura i cirkularnosti nukleusa ($r = -0,75$, $p < 0,01$)

Procenat heterohromatina u nukleusu takođe negativno korelira sa brojem autofagičnih struktura ($r = -0,86$, $p < 0,01$) i brojem autolizozoma ($r = -0,86$, $p < 0,01$) (Grafikon 4.11.2). Postoji pozitivna korelacija između procenta heterohromatina u nukleusu i parametara oblika nukleusa cirkularnosti, oblosti i solidnosti ($r = 0,9$; $r = 0,72$; $r = 0,98$ respektivno, $p < 0,01$).

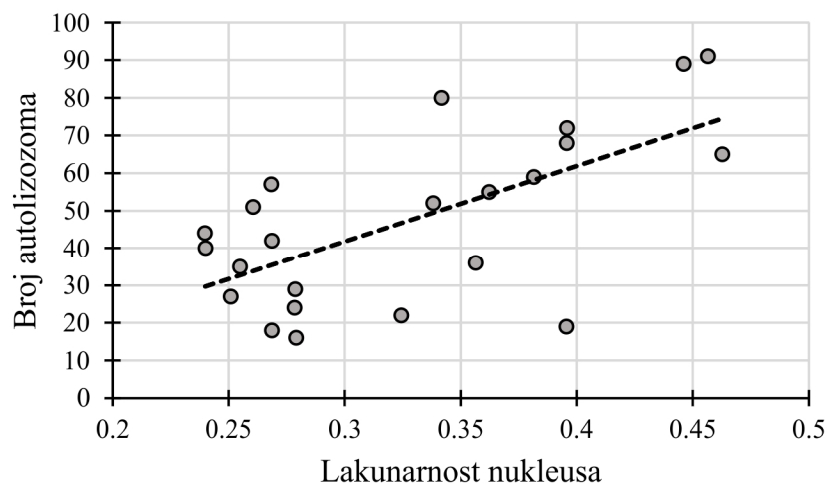
Proporcije nukleusa pozitivno koreliraju sa ukupnim brojem autofagičnih struktura ($r = 0,74$, $p < 0,01$), brojem autolizozoma ($r = 0,72$, $p < 0,01$) i negativno sa procentom heterohromatina u nukleusu ($r = -0,71$, $p < 0,01$).



Grafikon 4.11.2 Korelacija broja autolizozoma i procenta heterohromatina u nukleusu ($r = -0,86$, $p < 0,01$)

4.12 Korelacija morfometrijske analize autofagičnih struktura i fraktalne analize

Fraktalna dimenzija nukleusa negativno korelira sa ukupnim brojem autofagičnih struktura i brojem autolizozoma ($r = -0,54$; $r = -0,55$ respektivno, $p < 0,01$). Lakunarnost nukleusa pozitivno korelira sa ukupnim brojem autofagičnih struktura i brojem autolizozoma ($r = 0,63$; $r = 0,65$ respektivno, $p < 0,01$) (Grafikon 4.12). Fraktalna dimenzija i lakunarnost nukleusa ne koreliraju sa volumenom autofagičnih struktura.



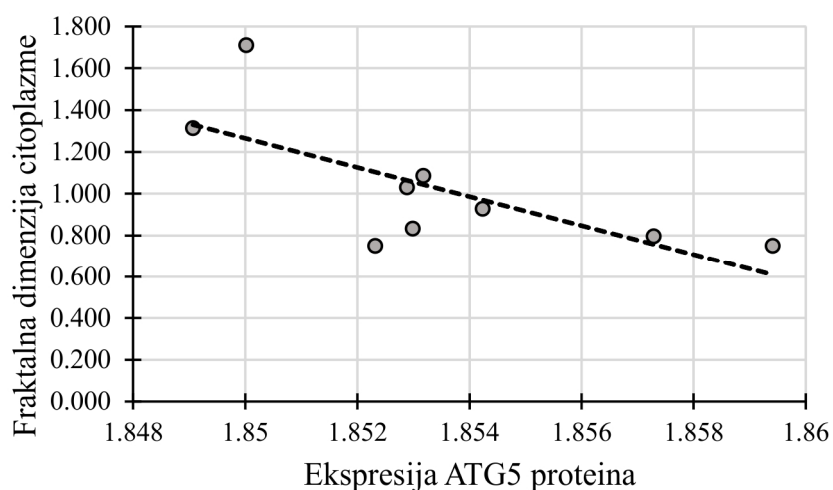
Grafikon 4.12 Korelacija broja autolizozoma i lakunarnosti nukleusa ($r = 0,65$, $p < 0,01$)

Varijansa teksturalnog matriksa nukleusa negativno korelira sa ukupnim brojem autofagičnih struktura i brojem autolizozoma ($r = -0,55$; $r = -0,55$ respektivno, $p < 0,01$). Ostali parametri teksturalne analize nukleusa ne koreliraju sa brojem i volumenom autofagičnih struktura.

Parametri fraktalne i teksturalne analize citoplazme ne koreliraju sa brojem i volumenom autofagičnih struktura.

4.13 Korelacija ultrastrukturne analize i ekspresije proteina uključenih u proces autofagije

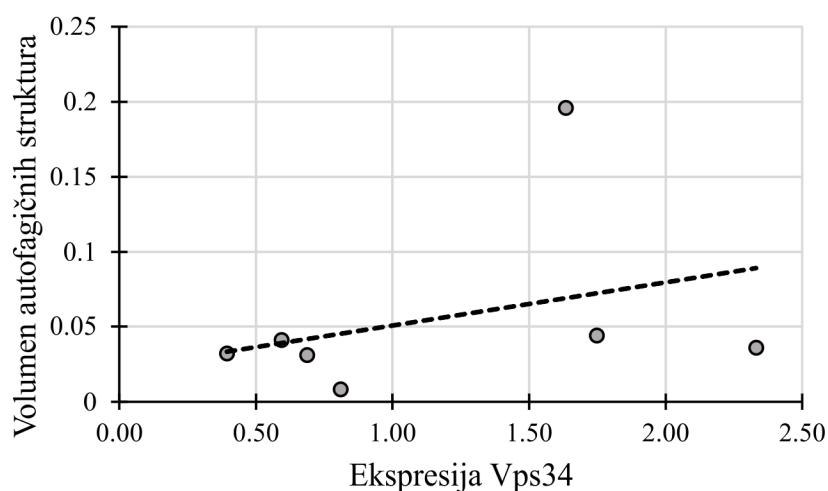
Ekspresija ATG5 proteina negativno korelira na fraktalnom dimenzijom citoplazme ($r = -0,71$, $p < 0,01$) (Grafikon 4.13) i fraktalnom dimenzijom nukleusa ($r = -0,62$, $p < 0,05$). Ekspresija p62 proteina pozitivno korelira sa lakunarnošću nukleusa ($r = 0,57$, $p < 0,05$), brojem nukleolusa ($r = 0,53$, $p < 0,05$) i prosečnim brojem Cajal-ovih tela u nukleusu ($r = 0,81$, $p < 0,01$)



Grafikon 4.13 Korelacija ekspresije ATG5 proteina i fraktalne dimenzije citoplazme ($r = -0,71$, $p < 0,01$)

4.14 Korelacija ultrastrukturne analize i ekspresije gena uključenih u proces autofagije

Ekspresija Vps34 pozitivno korelira sa brojem i volumenom fagofora i autofagozoma ($r = 0,93$; $r = 0,99$, $p < 0,01$ respektivno) (Grafikon 4.14) kao i sa veličinom ćelija ($r = 0,81$, $p < 0,05$). Postoji pozitivna korelacija u ekspresiji ATG4b gena i broju autofagičnih struktura, autolizozoma i mitofaga ($r = 0,99$; $r = 0,99$, $p < 0,01$; $r = 0,98$, $p < 0,05$ respektivno).



Grafikon 4.14 Korelacija ekspresije Vps34 gena i volumena fagofora i autofagozoma ($r = 0,997$, $p < 0,01$)

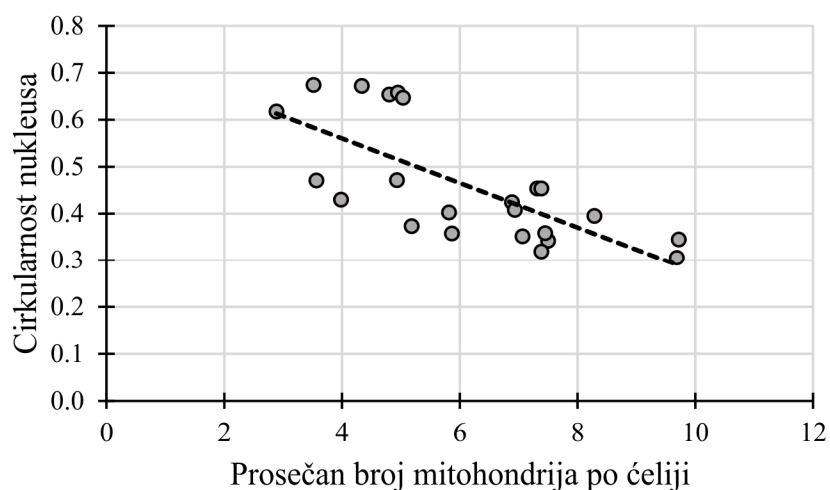
Pearson-ov koeficijent korelacije je pokazao da postoji pozitivna korelacija između volumena lipofaga i ekspresije gena ATG7, ATG13, BCL2, ULK1, FOXO1, AMBRA, FIP200, UVARAG, GABARAP, ATG14 i FOXO3 ($r = 0,92$; $r = 0,88$; $r = 0,82$; $r = 0,93$; $r = 0,79$; $r = 0,81$; $r = 0,94$; $r = 0,96$; $r = 0,89$, $p < 0,01$; $r = 0,73$; $r = 0,67$, $p < 0,05$ respektivno). Ekspresija ATG 14 i FIP200 pozitivno korelira i sa brojem lipofaga u ćeliji ($r = 0,87$, $p < 0,01$; $0,66$, $p < 0,05$ respektivno).

Pozitivna korelacija postoji i između volumena lipidnih kapi i ekspresije gena UVARAG, ATG7, ATG13, ULK1, FIP200, GABARAP ($r = 0,9$; $p < 0,01$; $r = 0,73$; $r = 0,67$; $r = 0,7$; $r = 0,73$; $r = 0,69$, $p < 0,05$ respektivno).

Ekspresija ATG4b gena negativno korelira sa oblašću nukleusa ($r = -0,99$, $p < 0,01$), cirkularnošću nukleusa ($r = -0,97$, $p < 0,05$) i solidnošću nukleusa ($r = -0,96$, $p < 0,05$) i pozitivno sa proporcijama nukleusa ($r = 0,99$, $p < 0,01$). Parametar teksturalne analize citoplazme, teksturalna korelacija pozitivno korelira sa ekspresijom gena FOXO1 i BECN ($r = 0,97$, $p < 0,01$; $r = 0,97$, $p < 0,05$ respektivno), a parametar teksturalna varijansa negativno ($r = -0,92$, $p < 0,01$; $r = -0,95$, $p < 0,05$ respektivno).

4.15 Korelacija broja mitohondrija sa parametrima oblika nukleusa

Prosečan broj mitohondrija po ćeliji korelira negativno sa parametrima oblika nukleusa: cirkularnošću ($r = -0,71$, $p < 0,01$) (Grafikon 4.15), oblašću ($r = -0,5$, $p < 0,05$) i solidnošću ($r = -0,7$, $p < 0,01$), kao i sa procentom heterohromatina ($r = -0,65$, $p < 0,01$) u nukleusu. Proporcije nukleusa ($r = 0,5$, $p < 0,05$) pozitivno koreliraju sa prosečnim brojem mitohondrija po ćeliji.

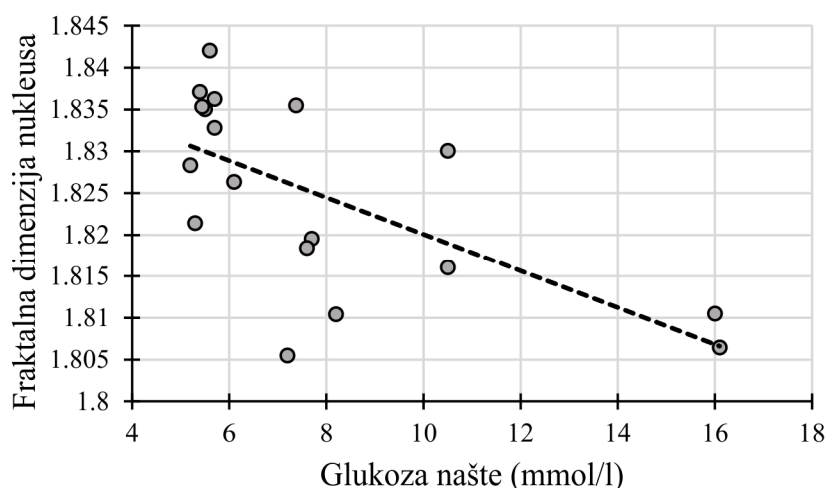


Grafikon 4.15 Korelacija prosečnog broja mitohondrija i cirkularnosti nukleusa ($r = -0,71$, $p < 0,01$)

Broj mitohondrija po ćeliji pozitivno korelira sa ekspresijom beklina ($r = 0,65$, $p < 0,05$).

4.16 Korelacija nivoa glukoze sa morfološkim parametrima

Nivo glukoze našte je negativno korelirao sa fraktalnom dimenzijom nukleusa ($r = -0,65$, $p < 0,01$) (Grafikon 4.16) i fraktalnom dimenzijom citoplazme ($r = -0,56$, $p < 0,05$). Negativna korelacija je nađena i sa cirkularnošću ($r = -0,52$, $p < 0,05$), parametrom oblika nukleusa.



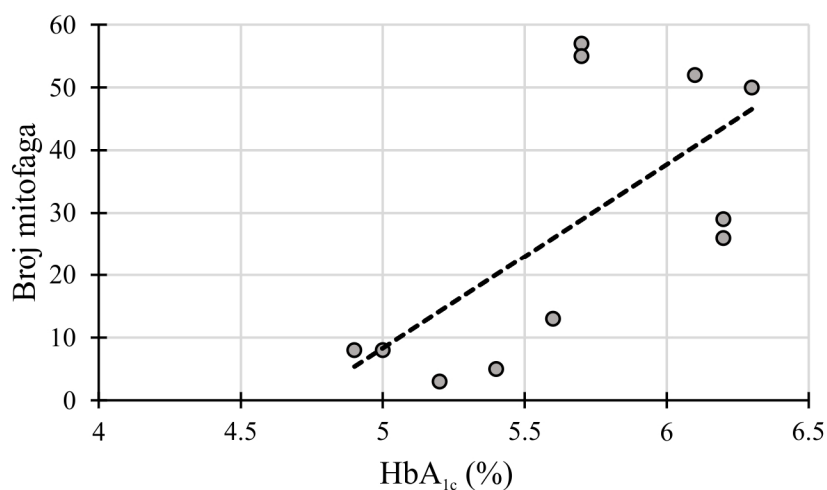
Grafikon 4.16 Korelacija vrednosti glukoze našte i fraktalne dimenzije nukleusa ($r = -0,65$, $p < 0,01$)

Broj mitofaga i LC3 punkta ($r = 0,63$; $r = 0,61$ respektivno, $p < 0,05$) je pozitivno korelirao sa nivoom glukoze našte. Za razliku od fraktalne dimenzije, lakunarnost nukleusa i citoplazme ($r = 0,59$, $p < 0,01$; $r = 0,57$, $p < 0,05$ respektivno) je pozitivno korelirala sa nivoom glukoze našte. Pozitivna korelacija je nađena i sa procentom površine lipidnih kapi u citoplazmi ($r = 0,59$, $p < 0,01$).

4.17 Korelacija vrednosti HbA_{1c} sa morfološkim parametrima

Vrednost HbA_{1c} u krvi je negativno korelirala sa parametrima oblika nukleusa (cirkularnost, $r = -0,64$, $p < 0,01$ i solidnost, $r = -0,66$, $p < 0,01$), sa procentom površine heterohromatina u nukleusu ($r = -0,63$, $p < 0,01$) i fraktalnom dimenzijom hromatinskih struktura ($r = -0,67$, $p < 0,01$).

Pozitivna korelacija HbA_{1c} je nađena sa lakunarnosti nukleusa ($r = 0,54$, $p < 0,01$), GLCM angularnim drugim momentom nukleusa ($r = 0,54$, $p < 0,05$), prosečnim brojem Cajal-ovih tela u nukleusu ($r = 0,56$, $p < 0,01$), brojem mitofaga ($r = 0,66$, $p < 0,05$) (Grafikon 4.17) i brojem LC3 punkta ($r = 0,61$, $p < 0,05$).

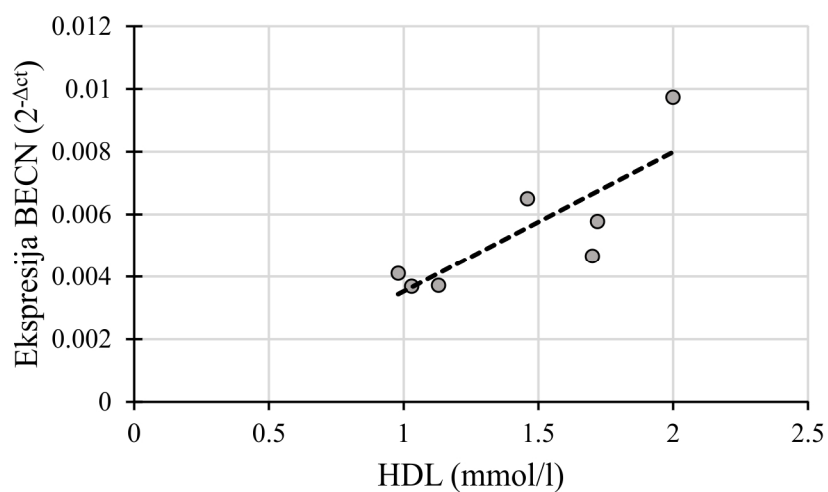


Grafikon 4.17 Korelacija vrednosti HbA_{1c} i broja mitofaga ($r = 0,66$, $p < 0,05$)

4.18 Korelacija lipidnih parametara sa morfološkim parametrima

Pearson-ov koeficijent korelacije je pokazao da nivo triglicerida u krvi negativno korelira sa fraktalnom dimenzijom nukleusa ($r = -0,66$, $p < 0,01$), parametrima teksturalne analize citoplazme ASM ($r = -0,61$, $p < 0,01$) i IDM ($r = -0,53$, $p < 0,05$) i pozitivno sa prisustvom interhromatinskih granula u nukleusima limfocita ($r = 0,53$, $p < 0,01$).

Nivo ukupnog holesterola i nivo LDL-a u krvi pozitivno korelira sa površinom autofagičnih struktura ($r = 0,61$; $r = 0,63$ respektivno, $p < 0,01$) i sa ekspresijom Vps34 gena ($r = 0,87$; $r = 0,87$ respektivno, $p < 0,05$), dok nivo HDL-a pozitivno korelira sa ATG4b, BECN (Grafikon 4.18), FOXO1 i FOXO3 ($r = 0,99$, $p < 0,01$; $r = 0,82$; $r = 0,65$; $r = 0,65$, $p < 0,05$ respektivno).



Grafikon 4.18 Korelacija nivoa ekspresije BECN i nivoa HDL-a u krvi ($r = 0,82$, $p < 0,05$)

5. DISKUSIJA

U savremenim istraživanjima T2DM, retke su studije u kojima je analizirana ultrastruktura limfocita elektronskim mikroskopom. Njihova ultrastruktura je ispitivana u cilju ispitivanja promene ultrastrukturnih karakteristika mitohondrija i njihovog membranskog potencijala,¹⁰² ili uticaja mitohondrija na apoptozu limfocita u ovoj bolesti.¹⁰³ Ova istraživanja su pokazala da su mitohondrije manje mase u T2DM, izmenjenog membranskog potencijala¹⁰² i da mogu da pokrenu mitohondrijalni put apoptoze u limfocitima.¹⁰³ Međutim, pretragom literature nismo našli studije koje su elektronskim mikroskopom analizirale autofagične strukture u ovim ćelijama.

U dosadašnjim istraživanjima limfocita u T2DM su istraživači ili sve bolesnike sa dijabetesom uzimali kao jednu grupu bez obzira na primenjenu terapiju⁷² ili su bolesnike sa T2DM razdvajali u dve grupe bolesnika: bolesnike koje nisu prethodno uzimali antidijabetsku terapiju (bez obzira na terapiju statinima) i bolesnike koje su imali metformin u terapiji uz druge oralne antidijabetike.¹⁰⁴ U našoj studiji ispitanike sa T2DM smo podelili u tri odvojene grupe: novootkrivene bolesnike sa T2DM koji nisu uzimali nikakvu antidijabetsku terapiju, bolesnike na terapiji metforminom i bolesnike na terapiji insulinom, da bismo mogli da razdvojimo efekat same bolesti i efekte primenjene terapije na pojavu autofagije u limfocitima. Takođe, ekskluzioni kriterijum je bila terapija statinima, pošto su novija istraživanja pokazala da statini indukuju autofagiju u ćelijama.¹⁰⁵

Ispitivane grupe bolesnika u našoj studiji su se razlikovale u vrednostima HbA_{1c}, i međusobno i u odnosu na zdrave ispitanike, što je očekivano jer HbA_{1c} pokazuje nivo glukoze u krvi tokom proteklih par meseci.¹² Novootkriveni bolesnici su imali značajno veće nivoe insulina u odnosu na zdrave, ali se vrednosti glukoze naše u krvi nisu statistički razlikovale, iako su bile veće u grupi novootkrivenih bolesnika. Vrednosti glukoze u krvi su se značajno razlikovale samo kod bolesnika sa T2DM na terapiji insulinom, zbog loše regulacije glikemije. Indeks telesne mase se razlikovao samo kod bolesnika na terapiji insulinom. Broj godina nije značajno varirao između ispitivanih

grupa, kao ni lipidni status, osim značajno višeg nivoa triglicerida kod bolesnika na terapiji metforminom. Veće vrednosti HbA_{1c} i indeksa telesne mase kod bolesnika sa T2DM u odnosu za zdrave ispitanike, detektovane su i u grupama ispitanika u drugim studijama.^{72, 102, 104} Međutim, u ovim studijama kod bolesnika sa T2DM detektovane su niže vrednosti lipidnih parametara^{72, 102, 104} nego kod zdravih, što je najverovatnije posledica terapije statinima primenjenim kod bolesnika u ovim studijama. U našoj studiji lipidni status bolesnika nije se značajno razlikovao od zdravih ispitanika. Bolesnici sa T2DM u našoj studiji, imali su više nivoe triglicerida, što je bilo karakteristično i za bolesnike u drugim studijama bez obzira na primenjenu terapiju statinima.

Naša studija je pokazala da su limfociti u T2DM slične veličine kao i limfociti zdravih osoba, ali da se izgled njihovih nukleusa razlikuje od nukleusa zdravih osoba, tj. da je nepravilnog oblika sa povećanom količinom euhromatina. Elektronsko mikroskopskom analizom detektovan je veći broj organela u citoplazmi limfocita bolesnika sa T2DM, koji se prvenstveno ogleda u povećanom broju mitohondrija u odnosu na limfocite zdravih osoba. Međutim, iako bi se moglo očekivati metodama ultrastrukturne morfometrije nije utvrđeno povećanje volumena citoplazme u limfocitima bolesnika sa T2DM.

Nedavna istraživanja pokazala su da su mitohondrije u T2DM manje,^{102, 106} više sferične i hiperpolarizovane sa povećanom produkcijom kiseoničnih radikala,¹⁰² što ukazuje na promene u metabolizmu u ovoj bolesti. U našoj studiji, analiza broja mitohondrija po ćeliji je pokazala da postoji značajno veći broj mitohondrija u limfocitima novootkrivenih bolesnika sa T2DM i kod bolesnika lečenih metforminom. Njihova ultrastrukturna morfologija se nije razlikovala od mitohondrija kod zdravih ispitanika, čime se isključuje mogućnost da je do promena došlo usled tehničke manipulacije sa uzorcima ćelija ili kao posledica fiksacije ćelija. Značajno veći broj mitohondrija uočen je u limfocitima bolesnika sa T2DM koji su imali nepravilniji oblik nukleusa sa više euhromatina, što može ukazati na promenjeni metabolički status u ovim ćelijama.

U limfocitima bolesnika sa T2DM uočeno je i diskretno oštećenje endoplazminog retikuluma, u vidu njegove dilatacije koje je bilo češće prisutno kod novootkrivenih bolesnika i bolesnika na terapiji metforminom. Nalaz stresa endoplazminog retikuluma u

T2DM se smatra odgovorom na metabolički stres,¹⁰⁷ a uzrokovan je povećanom glikemijom i povećanim nivoima lipidnih parametara koji dovode do glikotoksičnosti i lipotoksičnosti.¹⁰⁸

Primećen je i pad broja i volumena lipidnih kapi kod novootkrivenih bolesnika sa T2DM i njihovo povećanje kod bolesnika na terapiji. Na broj i veličinu lipidnih kapi utiče katabolizam i apsorpcija masti, kao i interakcija sa drugim organelama.¹⁰⁹ T2DM se odlikuje poremećajima u insulinom stimulisanom preuzimanju glukoze i u sposobnosti insulina da potisne oksidaciju lipida,¹¹⁰ što je najverovatnije uzrok smanjenja broja i volumena lipidnih kapi u grupi novootkrivenih bolesnika. Insulin podstiče ponovno formiranje lipidnih kapi i vraćanje njihovog broja na bazalni nivo,¹¹¹ što objašnjava povećanje njihovog broja i volumena u grupi bolesnika sa T2DM tretiranih insulinom. Metformin smanjuje insulinsku rezistenciju¹¹² i time omogućava da insulin ispolji svoje efekte na metabolizam lipidnih kapi.

Ispitivanjem limfocita bolesnika sa T2DM na elektronskom mikroskopsku uočen je neobičan izgled nukleusa u njima, koji se razlikovao od izgleda nukleusa u limfocitima zdravih osoba. Nepravilan oblik nukleusa je ranije viđen u oralnim epitelnim ćelijama⁸² i u cilijarnom epitelu⁸¹ u dijabetesu. Naš nalaz nepravilnosti oblika nukleusa u još jednom ćelijskom tipu, mogao bi da ukaže na činjenicu da su nepravilnosti oblika nukleusa čest nalaz u dijabetesu. Oblik nukleusa limfocita u T2DM podseća na nukleuse kakvi se viđaju u ćelijama Sezary sindroma⁸⁴ i u stanjima asociranim sa antigen specifičnom aktivacijom limfocita *in vitro*.⁸⁷ Može se špekulisati da naš nalaz morfoloških promena u nukleusima limfocita može biti zbog aktivacije ovih ćelija koja može voditi nastanku autoimunosti, za koju se veruje da postoji u T2DM.^{22, 113} Međutim, u ovakvim okolnostima bismo očekivali da vidimo mali broj limfocita koji izgledaju kao da su aktivirani, ali u našem slučaju morfološke promene su uniformne i prisutne u većini limfocita periferne krvi. Zbog toga verujemo da ove nuklearne promene ne potiču od aktivacije limfocita *per se*, već pokazuju promenjeni transkripcioni i/ili metabolički status ovih ćelija, koje mogu biti podloga za dalje imunološke poremećaje koji se viđaju u dijabetesu.

Nepravilan oblik nukleusa je, takođe, bio prisutan kod bolesnika koji su lečeni sa metforminom i insulinom i to bi moglo da znači da su ove morfološke promene nastale u početku bolesti i da ostaju prisutne tokom čitavog prirodnog toka bolesti, bez obzira na

primenjenu antidijabetsku terapiju. Iako bismo očekivali da promene oblika nukleusa budu prominentnije sa dužinom trajanja bolesti, konvencionalne kompjuterizovane metode analize slike nisu detektovale takve promene u našoj studiji.

Zajedno sa nepravilnostima oblika nukleusa, našli smo i veći procenat euhromatina u nukleusima limfocita bolesnika sa T2DM koji može biti povezan sa povećanom transkripcionom aktivnošću ovih ćelija u dijabetesu. Povećani broj nukleolusa u nukleusima novootkrivenih i metforminom lečenih bolesnika sa T2DM podržava teoriju da su ćelije transkripciono aktivnije nego limfociti zdravih osoba, s obzirom da je nukleolus mesto sinteze ribozomalne ribonukleinske kiseline (rRNK) i spajanja ribozomalnih subjedinica.¹¹⁴

Razlike u ultrastrukturnom izgledu hromatinskih struktura u limfocitima koje smo otkrili u našoj studiji, bili su razlog da, uz konvencionalne kompjuterizovane metode analize slike, primenimo fraktalnu i teksturalnu analizu nukleusa. Fraktalna analiza je pogodna za merenje prostornih parametara nepravilnih bioloških struktura,¹¹⁵ tako da smo je primenili zajedno sa morfometrijskim metodama i konvencionalnim kompjuterizovanim metodama analize slike u evaluaciji hromatinskih struktura. Analiza fraktalne dimenzije nukleusa je korišćena u analizi tumorskih ćelija,^{116, 117} gde je nađen porast procenta heterohromatina i promenjena prostorna distribucija hromatinske gustine, i u analizi nukleusa apoptotskih ćelija gde su nađene razlike u prečniku i fraktalnoj dimenziji između apoptotskih i neapoptotskih ćelija.¹¹⁸

Fraktalna analiza nukleusa, kako smo i očekivali, bila je odgovarajući metod za detekciju strukturnih promena nukleusa između bolesnika sa T2DM i zdravih osoba. Ovaj metod analize morfoloških promena u nukleusu je bio superiorniji u odnosu na ostale u detekciji suptilnih razlika u strukturi nukleusa između različitih grupa bolesnika sa T2DM koje konvencionalne metode analize slike nisu detektovale. Fraktalna analiza i teksturalna analiza su bila jedina dva kompjuterska metoda analize slike koji su bili dovoljno senzitivni da otkriju razlike u nuklearnoj strukturi u grupi lečenih i nelečenih bolesnika sa T2DM. Razlike između metforminom lečenih i novootkrivenih bolesnika sa T2DM nađene su i u broju perihromatinskih granula, subnuklearnih struktura koje imaju ulogu u skladištenju različitih RNK.¹¹⁹ Nađeno je i povećanje broja interhromatinskih granula, mesta u nukleusu uključenih u metabolizam RNK,¹²⁰ kod bolesnika sa T2DM. Povećanje

broja ćelija na kojima se u preseku vide interhromatinske granule, pratilo je i povećanje broja Cajal-ovih tela, koja imaju centralnu ulogu u biogenezi i maturaciji malih nuklearnih ribonukleoproteina,¹²⁰ kod bolesnika sa T2DM. Nalaz ultrastrukturno različitih nukleusa u limfocitima metforminom i insulinom lečenih bolesnika može biti posledica dužeg trajanja bolesti ili efekat metformina i insulina na limfocite.

U potrazi za mogućim objašnjenjem pojave nepravilnog oblika nukleusa i povećanja procenta euhromatina u nukleusima limfocita bolesnika sa T2DM, korelirali smo nivoe glukoze, holesterola i triglicerida sa ultrastrukturnim karakteristikama nukleusa. S obzirom na činjenicu da bolesnici sa većim nivoom glukoze u krvi imaju nepravilniji oblik nukleusa, manji procenat heterohromatina i nižu fraktalnu dimenziju hromatinskih struktura nukleusa možemo zaključiti da promenjen oblik i struktura nukleusa može biti posledica hiperglikemije. Ranije su otkriveni različiti mehanizmi kojim ugljeni hidrati mogu dovesti do aktivacije gena.¹²¹ Neki geni su regulisani insulinom, dok su drugi regulisani samom glukozom.¹²¹ Na primer, izloženost visokim koncentracijama glukoze kod ljudi indukuje gen transformišućeg faktora rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, engl. *Transforming growth factor beta 1*), koji sadrži funkcionalno aktivne elemente koji reaguju na prisustvo glukoze (GIRE, engl. *glucose-response elements*).¹²² Regulacija genske transkripcije glukozom mogla bi da objasni korelaciju nivoa glukoze u perifernoj krvi i strukturnih nepravilnosti oblika nukleusa koju smo dobili u našoj studiji. Osim toga, naš nalaz da HbA_{1c}, koji daje informaciju o prosečnoj glikemiji tokom poslednja dva do tri meseca¹² takođe korelira sa nepravilnostima oblika i strukture nukleusa limfocita, dodatno učvršćuje naš stav da su nuklearne nepravilnosti povezane sa hiperglikemijom u T2DM. Za razliku od glukoze, nivoi holesterola nisu korelirali sa izgledom nukleusa bolesnika sa T2DM, dok su nivoi triglicerida korelirali samo sa fraktalnom dimenzijom nukleusa i prisustvom interhromatinskih granula, ukazujući na činjenicu da lipidni status nema mnogo uticaja na izgled nukleusa limfocita bolesnika sa T2DM.

Ultrastrukturnom analizom limfocita često smo detektovali autolizosome u ovim ćelijama kod bolesnika sa T2DM. Naša studija je prva u kojoj je autofagija u limfocitima u ovoj bolesti analizirana elektronskim mikroskopom.

Mnogo je kontroverzi oko uloge autofagije u dijabetesu. Nedavna istraživanja autofagije u limfocitima periferne krvi dala su oprečne rezultate, od onih koji tvrde da

postoji indukcija autofagije u limfocitima periferne krvi⁷² do onih koja tvrde da postoji supresija autofagije u ovim ćelijama.⁸⁹ U gore pomenutim studijama uglavnom su primenjene metode indirektna detekcije autofagije, te smo koristili analizu transmisionim elektronskim mikroskopom kao direktni metod vizuelizacije procesa autofagije u limfocitima bolesnika sa T2DM.

Ranije je istaknuto da smo u našu studiju uključili tri grupe bolesnika sa T2DM, da bismo utvrdili efekat same bolesti na morfologiju limfocita periferne krvi i efekte dve grupe najčešće korišćenih lekova u terapiji T2DM, metformina i insulina. Takođe, želeli smo da ispitamo efekat hiperglikemije na limfocite. Novija istraživanja su nagovestila da bi nivo glukoze mogao da ima efekat na proces autofagije,⁶⁹ pa smo želeli da ispitamo ćelije koje su kontinuirano izložene visokom nivou glukoze u svom okruženju i da koreliramo markere autofagije sa nivoom glukoze u krvi. Imajući u vidu da nivo glukoze u okruženju može da izazove autofagični odgovor u ćelijama, veći broj autofagičnih struktura nađen u limfocitima periferne krvi bolesnika sa T2DM koji su imali više vrednosti glikemije u vreme vađenja krvi nije neočekivan.

Zbog čestog nalaza mitohondrija kao i lipidnih kapi unutar autolizozoma na transmisionom elektronskom mikroskopu, posumnjali smo da je došlo do selektivne autofagije u ispitivanim limfocitima bolesnika sa T2DM, tj. do mitofagije, odnosno lipofagije. Međutim, broj lipofaga i broj mitofaga u limfocitima bolesnika sa T2DM nije se razlikovao od broja ovih autofagičnih struktura kod zdravih osoba. S obzirom na činjenicu da smo uočili razliku u broju mitohondrija između zdravih i bolesnika sa T2DM, a nismo uočili razliku u broju i volumenu lipidnih kapi između ispitivanih grupa, nastavili smo samo sa daljim detaljnim analizama mitofagije i drugim mikroskopskim metodama kvantifikovali ovaj tip selektivne autofagije.

Povećano prisustvo mitofagije, detektovano na konfokalnom mikroskopu, u našoj grupi bolesnika sa T2DM je u skladu sa rezultatima Bhansali i saradnika, koji su istraživali mitofagiju u leukocitima dijabetičnih pacijenata i zaključili da hiperglikemija može dovesti do progresivnog porasta oksidativnog stresa i promene u morfologiji mitohondrija.¹²³

Međutim, iako je povećano prisustvo mitofagije u limfocitima bolesnika sa T2DM u skladu sa prethodnim studijama, nalaz dobro očuvanih mitohondrija u autolizozomima

bio je neočekivan nalaz. Mitohondrije se uobičajeno brzo razgrađuju u autolizozomima usled dejstva lizosomalnih enzima, dok su u našem uzorku često u autolizozomima detektovane mitohondrije dobro očuvane strukture. Autolizozomi u našoj studiji su podsećali na autolizozome sa intaktnim ćelijskim materijalom kakvi se viđaju u *in vitro* tretmanu ćelija bafilomicinom A1, supstancom koja dovodi do inhibicije fuzije autofagozoma i lizozoma i do inhibicije acidifikacije lizozoma.²⁹ Autofagozomi i autolizozomi su strukture koje se elektronskim mikroskopom mogu jednostavno razlikovati: autofagozomi imaju dvostruku membranu, a autolizozomi imaju jednostruku membranu.²⁹ S obzirom na činjenicu da elektronskim mikroskopom nismo često detektovali autofagozome, kao i da smo očuvane mitohondrije našli u autolizozomima, pretpostavili smo da u limfocitima bolesnika sa T2DM nije došlo do inhibicije fuzije autofagozoma i lizozoma, već da su u njima lizozomi disfunkcionalni.

Kako bismo potvrdili povećanje broja autolizozoma u limfocitima bolesnika sa T2DM, metodama konfokalne mikroskopije detektovali smo kolokalizaciju LC3B, markera autofagije sa vitalnom bojom za lizozome (LysoTracker). Međutim, umesto očekivanog povećanja broja kolokalizovanih punkta kod bolesnika sa T2DM, dobili smo smanjenje broja ovih punkta. LysoTracker je vitalna boja koja se nakuplja u kiselim vezikulama unutar ćelija i pojedini autori čak predlažu da se može koristiti za detekciju abnormalnosti kiselosti ovih struktura¹²⁴ ili u istraživanjima efikasnosti fuzije autofagozoma i lizozoma.¹²⁵ Smanjenje broja autolizozoma dobijenih bojenjem lizozoma sa LysoTracker-om, može se objasniti neadekvatnim vezivanjem ove vitalne boje sa lizozomima, verovatno usled njihove smanjene kiselosti. Dalja ispitivanja mitofagije metodama konfokalne mikroskopije i detekcija povećanja broja kolokalizovanih punkta LC3B i MitoTracker-a, vitalne boje za mitohondrije, kod bolesnika sa T2DM govori u prilog činjenici da kod ovih bolesnika ipak dolazi do povećanja mitofagije, i samim tim, autofagije. Izostanak povećanja kolokalizacije LC3B i LysoTracker-a u T2DM, koji je u suprotnosti sa povećanjem kolokalizacije istog markera autofagije i MitoTracker-a, bio je još jedan morfološki nalaz koji je ukazivao na disfunkciju lizozoma.

Da bismo proverili da li imamo povećanje broja autofagičnih struktura kod bolesnika sa T2DM, kvantifikovali smo i LC3B punkta koja pokazuju broj autofagičnih struktura. Još jednom smo potvrdili povećanje broja autofagičnih struktura kod novootkrivenih bolesnika sa T2DM, bez obzira na manju kolokalizaciju LC3B sa

LysoTracker-om, što nas je ponovo navelo da posumnjamo da su lizozomi u našoj grupi bolesnika manje kiseli nego što je očekivano.

Metodama protočne citometrije, takođe nismo dobili očekivano povećanje broja kiselih vezikula u akridin oranž obojenim ćelijama kod bolesnika sa T2DM, što je još jedna od metoda detekcije prisustva autolizozoma. Odsustvo očekivanog povećanja broja kiselih vezikula u dijabetesu bio nam je još jedan od dokaza da je funkcija lizozoma u limfocitima ispitivanih bolesnika sa T2DM poremećena. Akridin oranž je kao i LysoTracker, boja koja se vezuje za kisele vezikule, u njima se nakuplja i protonuje te tako ostaje zarobljena unutar njih.¹²⁶ Za protonovanje boje i njen ostanak u vezikuli neophodan je nizak pH,¹²⁶ što potvrđuje našu pretpostavku da je promenjen pH u lizozomima kod T2DM bolesnika.

Za procenu autofagije se pored metoda elektronske i konfokalne mikroskopije koriste i imunoblot i qRT-PCR metode,²⁹ pa smo i njih primenili u našoj studiji. Nažalost, nismo dobili očekivanu razliku u ekspresiji ispitivanih gena i proteina uključenih u proces autofagije između zdravih ispitanika i novootkrivenih bolesnika sa T2DM i, s obzirom na takav rezultat, date analize nisu ni primenjene na druge dve grupe lečenih bolesnika. Mislimo da razlog za ovakav rezultat leži u malom broju ispitivanih bolesnika i njihovoj varijabilnosti. Elektronska mikroskopija, kao metoda vizuelizacije subcelularnih struktura u svakoj pojedinačnoj ćeliji, mnogo je senzitivnija metoda za kvantifikaciju autofagičnih struktura u malom uzorku, budući da smo njome dobili konstantan rezultat u svakoj grupi ispitanika i da su se sve tri grupe bolesnika razlikovale u broju autofagičnih struktura u odnosu na zdrave osobe. Bez obzira na izostanak razlike u nivou ekspresije različitih proteina i gena uključenih u proces autofagije između ispitivanih grupa, postoji pozitivna korelacija u ispitivanim genima sa različitim autofagičnim strukturama. Tako se ekspresija Vps34 povećava sa povećanjem broja i volumena fagofora i autofagozoma, ekspresija ATG4b se povećava sa povećanjem broja autofagičnih struktura, autolizozoma i mitofaga, dok se ekspresija ATG7, ATG13, BCL2, ULK1, FOXO1, AMBRA, FIP200, UVARAG, GABARAP, ATG14 i FOXO3 povećava sa volumenom lipofaga. Ekspresija ATG14 i FIP200 se povećava i sa povećanjem broja lipofaga.

Da bismo ispitali efekat terapije T2DM na proces autofagije, pored novootkrivenih bolesnika sa T2DM, ispitivali smo i limfocite periferne krvi bolesnika koji su na

dugogodišnjoj terapiji metforminom, kao početnom terapijom izbora za lečenje T2DM, te insulinom, koji se daje kada se drugim lekovima ne postižu zadovoljavajući nivoi glikemije.³ Primećena je razlika u broju autofagičnih struktura između različitih ispitivanih grupa bolesnika i premda ta razlika nije bila statistički značajna, bila je očekivana. Naime, zna se da metformin indukuje autofagiju aktivacijom AMPK i inhibicijom mTOR-a,¹²⁷ a da je insulin inhibira putem aktivacije mTOR-a²⁰, što se vidi i u našem nalazu broja autofagičnih struktura gde grupa bolesnika sa T2DM lečena metforminom ima prosečno najveći broj autofagičnih struktura, dok grupa tretirana insulinom ima najmanji.

Pošto na slikama sa elektronskog mikroskopa vidimo jedan veoma tanki 2D presek ćelije koja ima tri dimenzije i na kojima brojanje pojedinačnih struktura nekada nije u korelaciji sa veličinom ovih struktura⁹⁰, da bismo proverili da li je veći broj autofagičnih struktura kod bolesnika sa T2DM, uradili smo i volumetrijsku analizu autofagičnih struktura, na osnovu koje možemo da procenimo i zapreminski udeo ispitivane organele u odnosu na volumen citoplazme ćelije.⁹⁰ Volumetrijska analiza nam je potvrdila rezultat koji smo dobili kvantifikacijom - povećanje volumena postoji u svim grupama bolesnika sa T2DM, ali je značajno samo kod bolesnika lečenih metforminom, kod kojih su autolizozomi bili najvećeg volumena.

Novija istraživanja ukazuju na moguću ulogu hiperglikemije u poremećaju procesa autofagije,¹²⁸ kao i na uticaj slobodnih masnih kiselina na proces autofagije,¹²⁹ te smo korelirali nivo glukoze, holesterola i triglicerida sa različitim parametrima morfometrijske analize procesa autofagije. Pozitivna korelacija nivoa glukoze i vrednosti HbA_{1c} sa brojem mitofaga i LC3 punkta, dovodi nas do pretpostavke da hiperglikemija ima direktan uticaj na autofagiju u limfocitima periferne krvi. Korelacija nivoa ukupnog holesterola i LDL-a u krvi sa površinom autofagičnih struktura ukazuje da i promene u metabolizmu masti takođe utiču na proces autofagije, ili da su kod osoba koje imaju poremećaj lipidnog statusa autofagične strukture brojnije i veće. Nivo triglicerida u krvi je negativno korelirao sa parametrima homogenosti teksturalne analize citoplazme ukazujući da nivo triglicerida takođe utiče na veličinu autolizozoma.

Imajući u vidu da su fraktalna i teksturalna analiza nukleusa pokazale razlike između ispitivanih grupa bolesnika sa T2DM, primenili smo ovaj metod analize i na

citoplazmu limfocita. Fraktalna analiza se ovde pokazala superiornijom u odnosu na teksturalnu analizu i pokazala je razliku između bolesnika sa T2DM koji su lečeni metforminom i ostalih ispitivanih grupa. Ta razlika se ogledala u smanjenju kompleksnosti citoplazme i povećanju strukturnih praznina u citoplazmi, što odgovara nalazu većeg volumena autofagičnih struktura kod bolesnika na terapiji metforminom.

Da bismo proverili da li promene u obliku nukleusa utiču na proces autofagije, korelirali smo parametre morfometrijske analize autofagičnih struktura sa parametrima oblika nukleusa. Negativna korelacija parametara oblika nukleusa i procenta heterohromatina sa autofagičnim strukturama, ukazuje nam da u ćelijama u kojima nukleusi morfološki izgledaju aktivni, postoji povećanje broja autofagičnih struktura ukazujući na povećanu gensku aktivnost u tim ćelijama. Na ovakav zaključak navodi i negativna korelacija fraktalne dimenzije nukleusa sa brojem autofagičnih struktura i pozitivna korelacija lakunarnosti nukleusa sa brojem autofagičnih struktura. Izostanak korelacije teksturalne analize citoplazme sa brojem i veličinom autofagičnih struktura, ukazuje na činjenicu da metode fraktalne analize nisu pogodne za analizu citoplazme ćelije u cilju detekcije autofagičnih struktura najverovatnije, zbog prisustva drugih organela u ćeliji, čiji broj, veličina i položaj variraju i u ćelijama zdravih ispitanika.

Elektronsko mikroskopska analiza ćelija u različitim bolestima retko se primenjuje u savremenim istraživanjima. Savremene metode detekcije različitih ćelijskih procesa, uključujući i autofagiju, kao što su imunoblot i qRT-PCR, u mnogim studijama postale su jedini, iako indirektni načini detekcije ovih procesa. Rezultati naše studije ukazuju na činjenicu da su morfološke metode detekcije autofagije, posebno elektronska mikroskopija i dalje značajne metode detekcije autofagije, koje u nekim slučajevima mogu biti senzitivnije od molekularno bioloških metoda.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Veći broj autofagičnih struktura u limfocitima periferne krvi bolesnika sa T2DM detektovan mikroskopskim metodama posledica je disfunkcije lizozoma u ovim ćelijama. Elektronska mikroskopija se pokazala na našoj grupi bolesnika kao senzitivnija metoda detekcije autofagije od molekularnih metoda.
- Nukleusi limfocita bolesnika sa T2DM se razlikuju od nukleusa limfocita zdravih osoba po tome što su nepravilnog oblika i imaju veću količinu euhromatina. Nivo glikemije bolesnika sa T2DM utiče na izgled nukleusa u limfocitima bolesnika sa T2DM.
- Fraktalna analiza je pogodna metoda za ultrastrukturnu analizu nukleusa, ali ne i za ultrastrukturnu analizu citoplazme.
- Morfološki izgled nukleusa limfocita T2DM bolesnika u vezi je sa prisustvom autofagičnih struktura u ovim ćelijama.

7. LITERATURA

1. Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, Bennett PH. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12(10):616-22.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas.* 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.
3. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse; Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje Diabetes Mellitus-a. Drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje. Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije, Beograd; 2012.
4. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2(1):56-64.
5. Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, Pavkov ME. The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018; 25(2):121-132.
6. Marasco MR, Linnemann AK. β -cell Autophagy in Diabetes Pathogenesis. *Endocrinology.* 2018; 159(5):2127-2141.
7. World Health Organization. *Global status report on non-communicable diseases 2014.* Geneva: WHO Press; 2014.
8. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 19ed. McGraw-Hill, New York; 2017.
9. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014; 383(9922):1068-83.
10. Scheen AJ. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg.* 2003; 58(6):335-41.
11. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes—2017.* *Diabetes Care.* 2017; 40:S1-S135.

12. World Health Organization. Use of Glycated Haemoglobin (HbA_{1c}) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization; 2011.
13. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR; American Diabetes Association (ADA); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the ADA and the EASD. *Diabetes Care*. 2012; 35(6):1364-79.
14. Qaseem A, Barry MJ, Humphrey LL, Forcica MA; Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2017; 166(4):279-290.
15. He L, Wondisford FE. Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab*. 2015; 21(2):159-162.
16. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000; 348(3):607-614.
17. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013; 494(7436):256-260.
18. Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res*. 2011; 71(13):4366-4372.
19. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010; 120(7):2355-2369.
20. Yoon MS. The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. *Nutrients*. 2017; 9(11):1176.
21. Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends Biochem Sci*. 2017; 42(1):28-41.

22. Brooks-Worrell BM, Reichow JL, Goel A, Ismail H, Palmer JP. Identification of autoantibody-negative autoimmune type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011; 34(1):168–173.
23. Irvine WJ, McCallum CJ, Gray RS, Duncan LJ. Clinical and pathogenic significance of pancreatic-islet-cell antibodies in diabetics treated with oral hypoglycaemic agents. *Lancet*. 1977; 1(8020):1025-1027.
24. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, Chu CT, Codogno P, Cuervo AM et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*. 2011; 7(11):1273-94.
25. Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI et al. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*. 2011; 7(1):2-11.
26. Kim J, Lim YM, Lee MS. The Role of Autophagy in Systemic Metabolism and Human-Type Diabetes. *Mol Cells*. 2018; 41(1):11-17.
27. Kamitani M, Miyatsuka T, Miura M, Azuma K, Suzuki L, Himuro M et al. Heterogeneity of autophagic status in pancreatic β cells under metabolic stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 496(2):328-334.
28. Yin JJ, Li YB, Wang Y, Liu GD, Wang J, Zhu XO et al. The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic β cell death. *Autophagy*. 2012; 8(2):158-64.
29. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12(1):1-222.
30. Chang GR, Chiu YS, Wu YY, Chen WY, Liao JW, Chao TH et al. Rapamycin protects against high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J Pharmacol Sci*. 2009; 109(4):496–503.
31. Reifsnnyder PC, Flurkey K, Te A, Harrison DE. Rapamycin treatment benefits glucose metabolism in mouse models of type 2 diabetes. *Aging*. 2016; 8(11):3120–30.
32. Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, et al. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab*. 2013; 17(3):456–62.

33. Schindler CE, Partap U, Patchen BK, Swoap SJ. Chronic rapamycin treatment causes diabetes in male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 307(4):R434-443.
34. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 2012; 335(6076):1638–43.
35. Barlow AD, Nicholson ML, Herbert TP. Evidence for rapamycin toxicity in pancreatic β -cells and a review of the underlying molecular mechanisms. *Diabetes*. 2013; 62(8):2674–82.
36. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017; 36(13):1811-1836.
37. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010; 90:1383-1435.
38. Uytterhoeven V, Lauwers E, Maes I, Miskiewicz K, Melo MN, Swerts J et al. Hsc70-4 deforms membranes to promote synaptic protein turnover by endosomal microautophagy. *Neuron*. 2015; 88:735-748.
39. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*. 2011; 20:131-139.
40. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012; 22:407-417.
41. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol*. 2018; 20(3):233-242.
42. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008; 132:27-42.
43. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Blomgren K, Kroemer G. Autophagy in acute brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2016; 17: 467 – 484.
44. Zhu J, Wang KZ, Chu CT. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy*. 2013; 9:1663-1676.

45. Cherra SJ 3rd, Dagda RK, Chu CT. Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost? *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010; 36:125 – 132.
46. Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW et al. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol.* 2010; 190:533-539.
47. Søreng K, Neufeld TP, Simonsen A. Membrane Trafficking in Autophagy. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018; 336:1-92.
48. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(11):931-7.
49. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* 2018; 14(2):207-215.
50. Pamarthy S, Kulshrestha A, Katara GK, Beaman KD. The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways. *Mol Cancer.* 2018; 17(1):41.
51. Lambelet M, Terra LF, Fukaya M, Meyerovich K, Labriola L, Cardozo AK et al. Dysfunctional autophagy following exposure to pro-inflammatory cytokines contributes to pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2018; 9(2):96.
52. Zummo FP, Cullen KS, Honkanen-Scott M, Shaw JAM, Lovat PE, Arden C. Glucagon-Like Peptide 1 Protects Pancreatic β -Cells From Death by Increasing Autophagic Flux and Restoring Lysosomal Function. *Diabetes.* 2017; 66(5):1272-1285.
53. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011; 147:728-741.
54. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(12):759-74.
55. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003; 5(4):539-45.
56. Lin MG, Hurley JH. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 39:61-68.
57. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(2):132-139.

58. Levine B, Liu R, Dong X, Zhong Q. Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. *Trends Cell Biol.* 2015; 25(9):533-544.
59. Baskaran S, Carlson LA, Stjepanovic G, Young LN, Kim DJ, Grob P et al. Architecture and dynamics of the autophagic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Elife.* 2014; 3:e05115.
60. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation *Nat Cell Biol.* 2009; 11(12):1433-7.
61. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2009; 5(8):1180-5.
62. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2008; 182(4):685-701.
63. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27:107-32.
64. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell.* 2014; 55(2):238-52.
65. Kim YM, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park JM, Bae SS et al. mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell.* 2015; 57(2):207-18.
66. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy.* 2013; 9(2):124-37.
67. Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science.* 2012; 338(6109):956-9.
68. Hardie DG. AMPK – sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab.* 2014; 20(6):939-52.

69. Moruno F, Pérez-Jiménez E, Knecht E. Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells*. 2012; 1(3):372-95.
70. Kobayashi S, Xu X, Chen K, Liang Q. Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 2012; 8(4):577-92.
71. Maruyama R, Goto K, Takemura G, Ono K, Nagao K, Horie T et al. Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295(4):H1599-607.
72. Rovira-Llopis S, Díaz-Morales N, Bañuls C. Is Autophagy Altered in the Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23(13):1050-6.
73. Pavelka M, Roth J. *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*. 3ed. Springer, Vienna; 2015.
74. Cheville NF, editor. *Ultrastructural Pathology. The Comparative Cellular Basis of Disease*. 2ed. Wiley-Blackwell, Danvers; 2009.
75. Hossler FE. *Ultrastructure Atlas of Human Tissues*. John Wiley & Sons, Hoboken; 2014.
76. Sarikonda G, Pettus J, Phatak S, Sachithanatham S, Miller JF, Wesley JD et al. CD8 T-cell reactivity to islet antigens is unique to type 1 while CD4 T-cell reactivity exists in both type 1 and type 2 diabetes. *J Autoimmun*. 2014; 50:77-82.
77. Wang Y, Li YB, Yin JJ, Wang Y, Zhu LB, Xie GY et al. Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes. *Autophagy*. 2013; 9(3):272-7.
78. Gitelman SE, Bluestone JA. Regulatory T cell therapy for type 1 diabetes: May the force be with you. *J Autoimmun*. 2016; 71:78-87.
79. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, Rehman Q, Hasturk H, Apovian CM et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol*. 2011; 186(2):1162-72.
80. Alexandraki KI, Piperi C, Ziakas PD, Apostolopoulos NV, Makrilakis K, Syriou V et al. Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2:

- associations with low-grade systemic inflammation. *J Clin Immunol.* 2008; 28:314–321.
81. Oz ZS, Bektas S, Battal F, Atmaca H, Ermis B. Nuclear morphometric and morphological analysis of exfoliated buccal and tongue dorsum cells in type-1 diabetic patients. *J Cytol.* 2014; 31(3):139-143.
 82. Hallikerimath S, Sapra G, Kale A, Malur PR. Cytomorphometric analysis and assessment of periodic acid Schiff positivity of exfoliated cells from apparently normal buccal mucosa of type 2 diabetic patients. *Acta Cytol.* 2011; 55(2):197-202.
 83. Machowicz-Matejko E, Łańcut M, Jedrych B, Zakrzewski P, Czerny K. Ultrastructural changes of ciliary epithelial nucleus in experimental diabetes--an animal model. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.* 2002; 57(1):61-66.
 84. Lutzner MA, Jordan HW. The ultrastructure of an abnormal cell in Sézary's syndrome. *Blood.* 1968; 31(6):719-726.
 85. McNutt SN, Crain WR. Quantitative electron microscopic comparison of lymphocyte nuclear contours in mycosis fungoides and in benign infiltrates in skin. *Cancer.* 1981; 47(4):698-709.
 86. Meyer CJ, van Leeuwen AW, van der Loo EM, van de Putte LB, van Vloten WA. Cerebriform (Sézary like) mononuclear cells in healthy individuals: a morphologically distinct population of T cells. Relationship with mycosis fungoides and Sézary's syndrome. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1977; 25(2):95-104.
 87. Reinhold U, Herpertz M, Kukel S, Oltermann I, Uerlich M, Kreysel HW. Induction of nuclear contour irregularity during T-cell activation via the T-cell receptor/CD3 complex and CD2 antigens in the presence of phorbol esters. *Blood.* 1994; 83(3):703-706.
 88. Bronietzki AW, Schuster M, Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunol Cell Biol.* 2015; 93(1):25-34.
 89. Alizadeh S, Mazloom H, Sadeghi A, Emamgholipour S, Golestani A, Noorbakhsh F et al. Evidence for the link between defective autophagy and inflammation in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients. *J Physiol Biochem.* 2018 Apr 13. doi: 10.1007/s13105-018-0624-2.

90. Lucocq JM, Hacker C. Cutting a fine figure: On the use of thin sections in electron microscopy to quantify autophagy. *Autophagy*. 2013; 9:1443-8.
91. Pantic I, Nestic D, Basailovic M, Cetkovic M, Mazic S, Suzic-Lazic J et al. Chromatin Fractal Organization, Textural Patterns, and Circularity of Nuclear Envelope in Adrenal Zona Fasciculata Cells. *Microsc Microanal*. 2016; 22(6):1120-1127.
92. Lobo J, See EY, Biggs M, Pandit A. An insight into morphometric descriptors of cell shape that pertain to regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016; 10(7):539-553.
93. Koo HJ, Sung YS, Shim WH, Xu H, Choi CM, Kim HR et al. Quantitative Computed Tomography Features for Predicting Tumor Recurrence in Patients with Surgically Resected Adenocarcinoma of the Lung. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0167955.
94. Karperien A. FracLac for ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac>. 1999–2013
95. Pantic I, Petrovic D, Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Pantic S. Age-related reduction of chromatin fractal dimension in toluidine blue - stained hepatocytes. *Mech Ageing Dev*. 2016; 157:30-34.
96. Cabrera J. Texture analyzer. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/texture.html>. 2005
97. Cornish TB. GLCM_TextureToo. <http://tobycornish.com/downloads/imagej/>. 2007
98. Pantic I, Dimitrijevic D, Nestic D, Petrovic D. Gray level co-occurrence matrix algorithm as pattern recognition biosensor for oxidopamine-induced changes in lymphocyte chromatin architecture. *J Theor Biol*. 2016; 406:124-128.
99. Vucicevic L, Misirkic M, Janjetovic K, Vilimanovich U, Sudar E, Isenovic E et al. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy*. 2011; 7(1):40-50.
100. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.

101. Sumarac-Dumanovic M, Apostolovic M, Janjetovic K, Jeremic D, Popadic D, Ljubic A et al. Downregulation of autophagy gene expression in endometria from women with polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 440:116-124.
102. Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, Hagen TM, Smith AR, Kizhakekuttu TJ et al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Transl Res.* 2010; 156(1):15-25.
103. Xu H, Chen Y, Li Y, Xia F, Han B, Zhang H et al. Mitochondrial apoptosis of lymphocyte is induced in type 2 diabetes. *Chin Med J (Engl).* 2014; 127(2):213-7.
104. Diaz-Morales N, Iannantuoni F, Escribano-Lopez I, Bañuls C, Rovira-Llopis S, Sola E et al. Does Metformin Modulate Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Type 2 Diabetic Peripheral Blood Mononuclear Cells? *Antioxid Redox Signal.* 2018; 28(17):1562-1569.
105. Zhang J, Yang Z, Xie L, Xu L, Xu D, Liu X. Statins, autophagy and cancer metastasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(3):745-52.
106. Rusu MC, Mănoiu VS, Vrapciu AD, Hostiuc S, Mirancea N. Altered Mitochondrial Anatomy of Trigeminal Ganglia Neurons in Diabetes. *Anat Rec (Hoboken).* 2016; 299(11):1561-1570.
107. Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Cells.* 2018; 7(6). pii: E63.
108. Mukherjee A, Morales-Scheihing D, Butler PC, Soto C. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends Mol Med.* 2015; 21:439–449.
109. Boschi F, Rizzatti V, Zamboni M, Sbarbati A. Lipid droplets fusion in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: a Monte Carlo simulation. *Exp Cell Res.* 2014; 321(2):201-8.
110. Højlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J.* 2014; 61(7):B4890.
111. Engin AB, Engin A, editors. Obesity and Lipotoxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology Vol 960.* Cham: Springer International Publishing AG; 2017.

112. Wróbel MP, Marek B, Kajdaniuk D, Rokicka D, Szyborska-Kajane A, Strojek K. Metformin - a new old drug. *Endokrynol Pol.* 2017; 68(4):482-496.
113. Zhai X, Qian G, Wang Y, Chen X, Lu J, Zhang Y et al. Elevated B Cell Activation is Associated with Type 2 Diabetes Development in Obese Subjects. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 38(3):1257-1266.
114. Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G. The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7). pii: E1411.
115. Mandelbrot BB. *The Fractal Geometry of Nature.* W. H. Freeman and Company, San Francisco; 1982.
116. Phulari RG, Rathore RS, Talegaon TP. Nuclear fractal dimension: A new objective approach for discriminating normal mucosa, dysplasia and carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016; 20(3):400-404.
117. Ferro DP, Falconi MA, Adam RL, Ortega MM, Lima CP, de Souza CA et al. Fractal characteristics of May-Grünwald-Giemsa stained chromatin are independent prognostic factors for survival in multiple myeloma. *PLoS One.* 2011; 6(6):e20706.
118. Kuo HR, Lapidus A, Lambert WC. Identification of early apoptosis in feulgen-stained cultured cells in situ by computerized image analysis. *Cytometry.* 1998; 33(4):420-427.
119. Puvion E, Puvion-Dutilleul F. Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp Cell Res.* 1996; 229(2):217-225.
120. Bogolyubov D, Stepanova I, Parfenov V. Universal nuclear domains of somatic and germ cells: some lessons from oocyte interchromatin granule cluster and Cajal body structure and molecular composition. *Bioessays.* 2009; 31(4):400-9.
121. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* 2000; 275(41):31555-31558.
122. Weigert C, Brodbeck K, Sawadogo M, Häring HU, Schleicher ED. Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF-beta1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells: up-regulation of USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem.* 2004; 279(16):15908-15915.

123. Bhansali S, Bhansali A, Walia R, Saikia UN, Dhawan V. Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8:347.
124. Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, Salvador N et al. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2004; 15:3132– 3145.
125. Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S et al. The apoptosis/autophagy paradox: Autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci*. 2005; 118:3091–3102.
126. Pierzyńska-Mach A, Janowski PA, Dobrucki JW. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry A*. 2014; 85(8):729-37.
127. Sui X, Xu Y, Wang X, Han W, Pan H, Xiao M. Metformin: A Novel but Controversial Drug in Cancer Prevention and Treatment. *Mol Pharm*. 2015; 12(11):3783-91.
128. Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, Akbas EM, Ozcicek A, Onk D et al. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian J Med Res*. 2016; 144(4):515-524.
129. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*. 2008; 8(4):325-32.

BIOGRAFIJA

Tamara Martinović rođena je u Beogradu, 1981. Diplomirala je 2010. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 8,54. Od druge godine studija bila je student demonstrator na Institutu za histologiju i embriologiju i moderator na histološkom forumu Retikulum. Završila je specijalističke akademske studije pod mentorstvom prof. Vesne Lačković 2013. na Medicinskom fakultetu u Beogradu, modul Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija i embriologija sa završnim specijalističkim akademskim radom "Strukturne i funkcionalne karakteristike citoskeletnih proteina i značaj njihove selektivne tkivne ekspresije u histopatološkoj dijagnostici".

Doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu upisala je 2012.

Na Institutu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu radi od 2011., trenutno u zvanju asistenta.

Angažovana je na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja 175038 „Imunopatogenetski i regulatorni mehanizmi u autoimunskim bolestima i hroničnoj inflamaciji“, III 41025 „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske bilans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ i projekta SANU F-35 „Istraživanje molekularnih mehanizama programirane smrti ćelija“.

Dr Tamara Martinović je bila dva puta na usavršavanju u Hamburgu u Centru za molekularnu neurobiologiju (ZMNH) Univerzitetske klinike Ependorf radi učenja tehnika konfokalne i imuno-elektronske mikroskopije.

Član je Udruženja patologa i citologa Srbije, Evropskog udruženja patologa, Srpskog društva za mikroskopiju i Evropskog društva za mikroskopiju.

Autor je jednog rada i koautor 11 radova sa SCI liste. Učesnik je brojnih stranih i domaćih kongresa, na kojima prezentovala rezultate u vidu 26 izvoda. Dobitnik je tri stipendije za učešće na međunarodnim skupovima.

Prilog 1.

8. Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tamara Martinović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

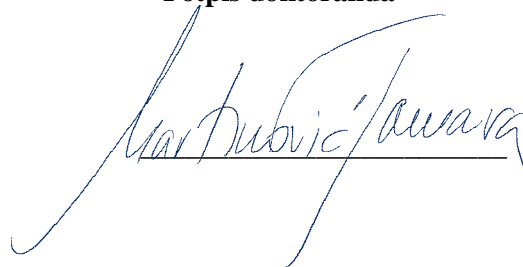
„Ultrastrukturne promene u limfocitima periferne krvi bolesnika sa Diabetes mellitus-om

tip 2“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.07.2018.



Tamara Martinović

Prilog 2.

9. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tamara Martinović

Broj upisa _____

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada „Ultrastrukturne promene u limfocitima periferne krvi bolesnika sa
Diabetes mellitus-om tip 2“

Mentor van. prof. dr Tamara Kravić-Stevović

Komentor van. prof. dr Katarina Lalić

Potpisani Tamara Martinović

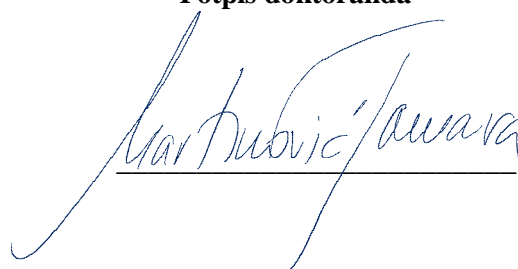
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.07.2018.



Tamara Martinović

Prilog 3.

10. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ultrastrukturalne promene u limfocitima periferne krvi bolesnika sa Diabetes mellitus-om tip 2“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

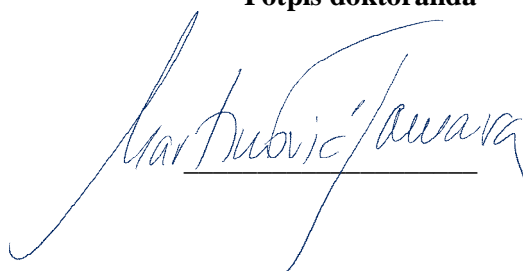
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.07.2018.



Marko Dukić

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.