

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.03.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Кораћ, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и Ане Станчић, вишег научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ о урађеној докторској дисертацији мр Миле Ј. Пајевић, главног биолога-технолога Службе за патохистологију Клиничког центра Србије и докторанда на Катедри за биологију ћелија и ткива Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване инсулином“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Александра Кораћ, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Ана Станчић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ и др Бато Кораћ, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација мр Миле Ј. Пајевић под насловом „Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване инсулином“ написана је на 68 страна и садржи 7 поглавља: Увод (20 страна), Циљ (1 страна), Материјал и методи (11 страна), Резултати (19 страна), Дискусија (8 страна), Закључци (3 стране), Литература (6 страна). На почетку дисертације приложен је апстракт на српском и енглеском језику. Дисертација садржи 10 табела и 23 слике. Поглавље литература садржи 74 библиографске јединице. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу УВОД, кандидаткиња је у оквиру девет потпоглавља изнела детаљан приказ значаја испитивања ремоделирања егзокриног панкреаса пацова под деловањем инсулина као модел-система студирања хиперинсулинемије која прати метаболичке поремећаје у контексту постојећих сазнања и литературних података. Уз коришћење већином оригиналних илустрација, приказана је локализација и анатомија панкреаса, као и хистолошка и цитолошка структура егзокриног и ендокриног панкреаса пацова. Иако се традиционално разматрају као посебни ентитети, егзокрина и ендокрина порција панкреаса остварују сложену анатомску и функцијску интеракцију у оквиру инсуло-ацинусне осе. Зато кандидаткиња даље описује сложен егзокрино-ендокрини однос кроз структурну повезаност и физиологију егзокриног панкреаса.

Инсуло-ацинусна оса је посебно од интереса у етиологији дијабетеса јер је показан пад амилазне и повећање трипсинске активности код дијабетичних пацова, а код људи оболелих од дијабетеса типа 2 долази до значајног смањења волумена панкреаса на рачун атрофије управо егзокриних ацинуса. Зато је кандидаткиња детаљно описала синтезу и секрецију зимогених гранула, улогу инсулина у функцији ацинуса и хиперинсулинемију као стање предијабетеса и метаболичког синдрома.

Постојање инсуло-ацинусне осе сведочи да егзокрини панкреас локално реагује на перипортални ниво инсулина структурним (ћелијско/ткивним) и функцијским променама и да је присуство инсулина неопходно за синтезу ензима и формирање зимогених гранула. Степен инсуло-ацинусне интеракције је висок и комплексан у физиолошком, а поготово у патолошком стању, стога је неопходно истраживати и стандардизовати хистолошке и цитолошке промене ацинуса изазване инсулином. Зато је у последњем потпоглављу кандидаткиња описала фракталне структуре у биолошким системима и значај који могу имати када се њима анализирају промене у ткивима и органима.

Полазећи од ових основа, мр Мила Ј. Пајевић је као ЦИЉ истраживања поставила расветљавање хистолошких промена егзокриног панкреаса и ултраструктурних промена ацинусних ћелија током ремоделирања, индукованог инсулином и то:

о морфолошких промена насталих у ткиву егзокриног панкреаса и хистолошке грађе панкреаса и ацинусне архитектуре која лежи у основи тих промена;

- о улоге уочених промена у дуалном ефекту инсулина на ацинусе, трофичком и атрофичком;
- о ефекта егзогеног инсулина на фракталну структуру егзокриног панкреаса;
- о ултраструктурних промена, синтетске и секреторне активности у ацинусним ћелијама панкреаса.

Поглавље МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ организовано је у више потпоглавља у којима су детаљно описани: (i) експериментални модел хиперинсулинемије изазване код пацова ниском (0.4 IU/kg телесне масе) или високом (4 IU/kg телесне масе) дозом које су аплициране акутно (једнодневни третман) или хронично (тродневни третман); (ii) изоловање панкреаса; (iii) припрема ткива за светлосну микроскопију и различити методи хистолошког и хистохемијског бојења ради структурне и фракталне анализе; (iiii) имунохисто- и имуноцитохемијска бојења; (iiiii) припрема ткива за трансмисиону електронску микроскопију; (iiiiii) ултраструктурна и морфометријско-стереолошка анализа, као и статистичка обрада добијених података.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ кандидаткиња је приказала добијене резултате у осам целина. У првој су приказани резултати анализе анатомије изолованих панкреаса, њихова маса и волумен. Након третмана инсулином присутан је тренд повећања масе и волумена независно од примењене дозе и дужине третмана. У другој и трећој целини су приказани резултати хистолошке и ултраструктурне анализе ткива егзокриног панкреаса, а посебна пажња посвећена је структурној и функцијској повезаности. Четврта и пета целина су резултати квантитативних метода, фракталне и морфометријско-стереолошке анализе. Оне су посматрене упоредо у циљу поређења класичних, рутинских метода и нове-фракталне. Инсулин је изазвао фино структурно ремоделирање ткива егзокриног панкреаса у нивоу везива, паренхима и ацинуса које је указало на модулацију функције.

Резултати анализе функцијског статуса егзокриног панкреаса кроз експресију α -амилазе приказани су у шестој целини и показали су дозну и временску зависност деловања инсулина на процес синтезе, сазревања зимогених гранула и њихове секреције у лумен. Утврђена је и разлика у присуству амилазе у изводним каналима егзокриног панкреаса. Ови резултати навели су на анализу нуклеуса ацинусних ћелија у смислу квантификовања моноклеусних у односу на бинуклеусне ћелије.

Резултати хистохемијског показивања и квантификације ДНК у нуклеусима моноклеусних у односу на бинуклеусне ћелије, као и имуноекспресија маркера пролиферације рННЗ – фосфорилисана форма хистона НЗ (*eng.* PhosphoHistone НЗ),

PCNA – нуклеусног антигена пролиферишућих ћелија (*eng.* Proliferating Cell Nuclear Antigen) и Ki-67 у ацинусним ћелијама приказани су у последњем, деветом потпоглављу. Узети заједно, резултати су показали да појава бинуклеусних ацинусних ћелија се може у овим експерименталним условима везати једино за транскрипциону активност а не и за патолошку хиперплазију ћелија.

У поглављу ДИСКУСИЈА представљена је анализа и интерпретација резултата добијених овим истраживањем. Добијене резултате мр Мила Ј. Пајевић повезује у одговарајуће целине и даје њихов значај у оквиру испитиване проблематике. У овом поглављу компетентно су дискутовани добијени резултати с освртом на литературне податке и вршено њихово поређење са истраживањима везаним за примену фракталне анализе.

Егзокрини део панкреаса је под утицајем хормона ендокриног, не само системски као остале ћелије, већ и директно, преко везе портног система ацинуса и Лангерхансовог острвца. У литератури је до сада контроверзно питање међусобног односа егзокриних ацинуса и главних хормона ендокриног панкреаса: инсулина, глукагона, соматостатина и панкреасног полипептида. Кандидаткиња резултате до којих је дошла у дисертацији дискутује у светлу тога. За глукагон је показано да *in vivo* инхибира, а *in vitro* стимулише секрецију ензима панкреаса код паса и пацова. Слично је показано и за панкреасни полипептид, уз податак да он стимулише и синтезу ДНК у нуклеусима ацинусних ћелија. Рецептори за соматостатин су показани на мембрани ацинусних ћелија и сматра се да он инхибира и базалну и стимулисану секрецију ензима.

Документована је улога инсулина у регенерацији егзокриног панкреаса у панкреатитису код човека, али су подаци из литературе и даље у великој мери контрадикторни. Резултати добијени у докторској дисертацији показују да најзначајнију улогу међу њима остварује инсулин с обзиром да је показано да изазива повећану синтезу панкреасних ензима у ацинусима а тиме и њихов раст. Ови подаци су веома значајни јер указују на нарушавање хомеостазе у оквиру инсуло-ацинусне осе, али је још увек нејасно да ли и у којој мери доприносе молекулским променама на нивоу синтезе инсулина, количине и квалитета β -ћелија панкреаса и/или специфичној архитектури егзокриног панкреаса.

Степен инсуло-ацинусне интеракције је висок и комплексан у физиолошком а поготово у патолошком стању, стога је неопходно истражити и стандардизовати хистолошке и цитолошке промене ацинуса изазване инсулином. Посебан проблем

представљају нестандардизоване методе за праћење хистолошких промена панкреаса ван хистопатологије, чиме се ограничава препознавање раних и значајних промена. Зато је мр Мила Ј. Пајевић промене егзокриног панкреаса анализирао упоредо морфометријско-стереолошки и фрактално и показала да фрактална димензија и лакунарност могу да издвоје и најфиније структурне промене и ткива у целини и појединачних ацинуса и ацинусних ћелија, што је по први пут показано у условима привремене и брзе хиперинсулинемије.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ мр Мила Ј. Пајевић сумира добијене резултате и износи преглед најзначајнијих закључака:

о Примењени инсулински третман индуковао је дозно- и временски-зависно структурно ремоделирање ткива егзокриног панкреаса, указујући на велики значај инсулина у одржавању његовог нормалног функционисања, али и потенцијалну улогу у етиологији метаболичких болести. Структурне промене запажене на хистолошком нивоу су упоредо квантификоване применом морфометрије и фракталне анализе.

Резултати хистолошке анализе показали су да:

о Акутни третман инсулином, са порастом дозе, повећава простор између ацинуса; нуклеуси ацинусних ћелија постају крупнији, а зимогене грануле ситније и сливене ка лумену ацинуса. Хроничним третманом инсулином, са порастом дозе, нуклеуси ацинусних ћелија постају ситнији, а зимогене грануле крупније и нагомилане у апикалном делу ћелије.

Морфометријска и фрактална анализа показале су да:

о акутни третман инсулином, независно од примењених доза, значајно повећава фракталну димензију ацинуса панкреаса и смањује лакунарност;

о хронични третман инсулином остварује супротан ефекат у односу на дозу – ниска доза значајно смањује фракталну димензију и повећава лакунарност ацинуса панкреаса, док висока доза значајно повећава фракталну димензију и смањује лакунарност ацинуса панкреаса.

Ефекат инсулина на експресију амилазе

Ултраструктурна анализа органела-маркера експресије секреторних протеина ацинусних ћелија и имуноекспресија амилазе у ацинусима панкреаса је показала да инсулин остварује краткорочни ефекат на стимулацију секреције зимогених гранула и дугорочни ефекат на стимулацију синтезе амилазе, ремоделирајући нуклеус и гранулисани ендоплазмични ретикулум:

о Акутна висока доза инсулина доводи до проширења гранулисаног ендоплазмичног ретикулума, смањења дијаметра зимогених гранула, редукције имуноекспресије амилазе у ацинусним ћелијама и њеног повећања у изводним каналићима,

док је хронична имала супротан ефекат. Акутно ниска и хронично висока доза инсулина значајно смањују волуменску густину гранула и повећавају волуменску густину цитоплазме.

о Ниска и спорадична имуноекспресија маркера пролиферације pHH3, Ki-67 и PCNA у ацинусним ћелијама, као и повећање броја бинуклеусних ћелија показали су да инсулин остварује значајан ефекат на активацију ћелијске транскрипције и транслације без хиперплазије ћелија, али уз задржавање пролиферативног потенцијала.

Пролазне хиперинсулинемије, карактеристичне за гојазност и ране фазе развоја дијабетеса и других метаболичких болести, подражаване у овим експериментима, доводе до значајних промена у структури егзокриног панкреаса и тиме стварају трајну подлогу за измењену функцију.

Фрактална анализа се показала као метод који може да издвоји и покаже најфиније хистолошке и цитолошке промене, и стога се може искористити као додатна или алтернативна дијагностичка метода рутинској хистологији за брзу и прецизну квантификацију дискретних промена у архитектури “здравог” ткива непосредно уз сам тумор.

Поглавље ЛИТЕРАТУРА садржи 74 библиографске јединице које су адекватно и на одговарајућим местима цитиране у тексту докторске дисертације. Желимо да истакнемо да је кандидаткиња цитирала сву расположиву литературу везану за фракталну анализу у биолошким системима јер се ради о потпуно новој области што додатно говори о студиозности у праћењу области истраживања.

Радови и конгресна саопштења која чине део докторске дисертације:

Б1. Рад у часопису међународног значаја:

Paјević M, Aleksic M, Golic I, Markelic M, Otasevic V, Jankovic A, Stancic A, M23
Korac B, Korac A. (2017) Fractal and stereological analyses of insulin-induced rat exocrine pancreas remodeling. *Folia Morphol (Warsz)*, [doi: 10.5603/FM.a2017.0106](https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0106).
https://journals.viamedica.pl/fovia_morphologica/article/view/55303

Мишљење и предлог комисије:

Докторска дисертација мр Миле Ј. Пајевић под насловом „Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване инсулином“ представља оригиналну научну студију из области биологије ћелије и ткива. Докторска дисертација је урађена у складу са циљевима наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе.

Комисија сматра да докторска дисертација мр Миле Ј. Пајевић представља значајан допринос разумевању структурних промена у ацинусима као последица финих молекулских модулација након апликације егзогеног инсулина. Такође, представља и допринос развоју и примени брзих метода за утврђивање и квантификовање промена егзокриног панкреаса у поремећајима који се сусрећу у метаболичком синдрому.

Поред промена структуре и ултраструктуре ацинуса и ацинусних ћелија егзокриног панкреаса у хиперинсулинемији, мр Мила Ј. Пајевић је указала на важне почетне промене у синтези и секрецији амилазе које могу довести до малнутриције и показала да је фрактална анализа брз и поуздан метод који квантификује најфиније морфолошке промене ткива. Резултати мр Миле Ј. Пајевић могу наћи примену и у патохистолошким анализама и на њој је да их сада уведе у свакодневну праксу.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај о урађеној докторској дисертацији мр Миле Ј. Пајевић под насловом „Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване инсулином“ и одобри њену јавну одбрану.

Комисија:

др Александра Кораћ, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Ана Станчић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду-Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“

др Бато Кораћ, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

У Београду, 19.04.2018. год.