

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

mr Mila J. Pajević

**MORFOLOŠKE PROMENE
EGZOKRINOLOG PANKREASA PACOVA
IZAZVANE INSULINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

mr Mila J. Pajević

**INSULIN-INDUCED MORPHOLOGICAL
CHANGES IN THE EXOCRINE
PANCREAS OF RAT**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2018

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

MENTORI:

dr Aleksandra Korać, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Ana Stančić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu-Institut za
biološka istraživanja "Siniša Stanković"

ČLAN KOMISIJE:

dr Bato Korać, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

DATUM ODBRANE: _____

Ekperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u laboratorijama **Katedre za biologiju ćelija i tkiva pri Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu** kao deo projekta 173055, pod nazivom **“Belo ili/i mrko: značaj masnog tkiva u održanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima”** Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kojim rukovodi prof. Bato Korać.

ZAHVALNICA

Svom mentoru, prof. Aleksandri Korać, dugujem neizmernu zahvalnost za sve čemu me je naučila, kao i za poverenje i podršku pruženu tokom svih ovih godina. Želim da joj se zahvalim na velikoj pomoći i korisnim smernicama u tumačenju rezultata i oblikovanju disertacije.

Dr Ani Stančić, veliko hvala na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja disertacije.

Prof. Batu Koraću ogromnu zahvalnost dugujem na prilici da radim u okviru projekta kojim rukovodi, stručnoj pomoći i sadržajnim sugestijama pri konačnom oblikovanju ove disertacije.

Dr Igoru Goliću veliko hvala na pomoći oko statističke obrade podataka i grafičkog predstavljanja rezultata, ali i na spremnosti da mi uvek pomogne korisnim savetima.

Mariji Aleksić veliko hvala za uloženi trud u eksperimente ove disertacije i spremnost da mi uvek pomogne.

Aniti Lazarević i Maji Bogdanović hvala za pomoć pri pripremanju preseka i izradi elektronskih mikrografija za rad.

Svim kolegama i kolegicama Službe za patohistologiju KCS hvala na nesebičnoj tehničkoj podršci pri izradi disertacije.

Svojoj sestri Nevenki dugujem neizmernu zahvalnost na bezrezervnoj i neprestanoj podršci.

Svom suprugu Milanu, ćerkama Jani i Dunji za inspiraciju, motivaciju, strpljenje i veru koju mi pružaju.

Mojim roditeljima, Radi i Jovanu, hvala na svemu što su mi pružili.

Njima je ova disertacija i posvećena.

MORFOLOŠKE PROMENE EGZOKRINOGR PANKREASA PACOVA IZAZVANE INSULINOM

SAŽETAK

Egzokrini i endokrini pankreas ostvaruju složenu anatomsku i funkcijsku interakciju. Naime, egzokrini deo pankreasa je pod uticajem hormona endokrinog, ne samo sistemski kao ostale ćelije organizma, već i direktno, preko veze portnog sistema acinusa i Langerhansovog ostrvca. Pokazano je da i endogeni i egzogeni insulin izazivaju povećanu sintezu pankreasnih enzima u acinusima, a time i njihov rast. Veza strukturnog (ćelijskog/tkivnog) i funkcijskog odgovora egzokrinog pankreasa na periportalni nivo insulina ukazuje na visok i kompleksan stepen insulo-acinusne interakcije u fiziološkim, a pogotovo u patološkim stanjima.

Cilj ove doktorske disertacije je da istraži histološke promene egzokrinog pankreasa i ultrastrukturne promene acinusnih ćelija tokom remodeliranja izazvanog insulinom.

U eksperimentu su korišćeni Wistar pacovi, starosti dva meseca. Pacovi su podeljeni u šest grupa, četiri grupe su primale *i.p.* nisku (0.4 IU) ili visoku (4 IU) dozu insulina, jedan (akutno) ili tri dana (hronično). Preostale dve grupe na isti način primale su fiziološki rastvor i predstavljale su odgovarajuće kontrole. Tri sata nakon poslednjeg tretmana, sve životinje su žrtvovane dekapitacijom. Odmah nakon žrtvovanja, pankreas je izolovan, slikan, izmeren i odvojen za svetlosnu elektronsku mikroskopiju. Efekti insulina na histološke promene egzokrinog pankreasa analizirane su svetlosnom mikroskopijom (hematoksilin/eozin bojenje, AZAN), fraktalnom analizom, imunohistohemijom (amilaza, pHH3 – fosforilisana forma histona H3 (*eng.* PhosphoHistone H3), Ki-67 i PCNA – nukleusni antigen proliferišućih ćelija (*eng.* Proliferating Cell Nuclear Antigen)) i elektronskom mikroskopijom (volumenska gustina citoplazme, dijametar i volumenska gustina zimogenih granula, broj i volumenska gustina nukleusa).

Kod insulinom tretiranih životinja primećene su diskretne promene u histološkoj građi egzokrinog pankreasa koje su se ogledale u više vezivnog i masnog tkiva u blizini izvodnih kanalića i krvnih sudova. Analiza elektronskih mikrografija acinusnih ćelija pokazala je da visoka, akutna doza insulina dovodi do proširenja granulisanog endoplazminog retikuluma i smanjenja zimogenih granula, a hronična do značajnog uvećanja dijametra zimogenih granula. U slučaju fraktalne analize akutni tretman, nezavisno od primenjenih doza, značajno je povećao fraktalnu dimenziju acinusa pankreasa i smanjio lakunarnost, ali je hronični tretman sa niskim dozama značajno smanjio fraktalnu dimenziju i povećavao lakunarnost acinusa pankreasa, dok je visoka doza imala suprotan efekat. Stereološke analize su pokazale da akutno niska i hronično visoka doza insulina značajno smanjuje volumensku gustinu granula i povećava volumensku gustinu citoplazme, dok je volumenska gustina nukleusa pokazala male promene. Visoka akutna doza insulina dovodi do smanjenja dijametra zimogenih granula, što dobro korelira sa redukcijom imuno-ekspresije amilaze u acinusnim ćelijama i njenim povećanjem u izvodnim kanalićima, a hronična ima suprotan efekat, što ide u prilog tome da insulin ima kratkoročni efekat na stimulaciju sekrecije i dugoročni efekat na stimulaciju sinteze amilaze. Efekat insulina u trajanju od tri dana ne dovodi do proliferacije acinusnih ćelija, što nam ukazuje bleđa i sporadična imuno pozitivnost za pHH3, Ki-67 i PCNA, tako da je uočeno povećanje broja binukleusnih ćelija posledica aktivacije transkripcije i translacije (povećanje granulisanog endoplazminog retikuluma i pojačana sekrecija amilaze).

KLJUČNE REČI: insulin, pankreas, amilaza, zimogene granule, acinusne ćelije, fraktalna analiza, stereologija, binukleusne ćelije.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

UDK BROJ: 612.349.8: [612.34+519.134] (043.3)

INSULIN-INDUCED MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE EXOCRINE PANCREAS OF RAT

ABSTRACT

Exocrine and endocrine pancreas achieves complex anatomical and functional interaction. Namely, the exocrine part of the pancreas is influenced by the endocrine hormone, not only systemically as other cells in organism, but also directly, via the islet acinar portal vascular system. It has been shown that both endogenous and exogenous insulin cause an increased synthesis of pancreatic enzymes in the acinus and hence their growth. The relationship between the structural (cellular/tissue) and functional response of exocrine pancreas to the periportal level of insulin indicates a high and complex level of insulin-acinus interaction in the physiological and especially in the pathological state.

The goal of this doctoral dissertation was to investigate the histological changes of exocrine pancreas and ultrastructural changes of acinar cells during insulin-induced remodeling.

Two-month-old male Wistar rats were used. Rats were divided into six groups, four groups were treated *i.p.* with low (0.4 IU) or high (4 IU) dose of insulin, one (acutely) or three (chronically) days. The other two groups, in the same way, were received 0.9% saline solution and served as a corresponding control. Three hours after the last injection, the animals were sacrificed by decapitation. Immediately after sacrificing, the pancreas was isolated, pictured, weighted and prepared for light and electron microscopy. The effect of insulin on the histological changes of exocrine pancreas was analyzed by light microscopy (hematoxylin/eosin staining, AZAN), fractal analysis, immunohistochemistry (amylase, pHH3, Ki67 and PCNA) and electron microscopy (volume density of cytoplasm, diameter and volume density of zymogene granules, as well as number and volume density of nuclei).

Discrete changes in the histological structure of exocrine pancreas were observed in insulin treated animals which are reflected in more connective and fat tissue

near the excretory ducts and blood vessels. In acute high-dose treatment transmission electron microscopy revealed enlarged granular endoplasmic reticulum and smaller zymogen granules, but chronic high-dose increased zymogen granules. In the case of fractal analysis, acute treatment, irrespective of the administered doses, significantly increased the fractal dimension and reduced lacunarity of pancreatic acinus, but chronic low-dose treatment significantly reduced the fractal dimension and increased lacunarity of the pancreatic acinus, while the high dose had the opposite effect. Stereological analyses have shown that an acutely low and chronically high dose of insulin significantly reduces the volume density of the granules and increases the volume density of the cytoplasm, while the volume density of the nucleus has shown mild and insignificant changes. The higher dose of insulin in acute treated group leads to a decrease in the diameter of the zymogene granules, which correlates well with the reduction immune-expression of amylase in acinus cells and increase in ducts, but the chronic has the opposite effect, suggesting that insulin has a short-term effects to potentiate zymogen release and long-term effects to regulate the synthesis of amylase. Three days of insulin does not lead to cell proliferation, which indicates a pale and sporadic immune-positivity for pHH3, Ki-67 and PCNA, and the occurrence of binuclear cells is the result of activation of cell transcription and translation (higher content of granular endoplasmic reticulum and secretion of amylase).

KEY WORDS: insulin, pancreas, amylase, zymogene granules, acinar cells, fractal analysis, stereology, binuclear cells.

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Cell and Tissue Biology

UDC NUMBER: 612.349.8: [612.34+519.134] (043.3)

SADRŽAJ

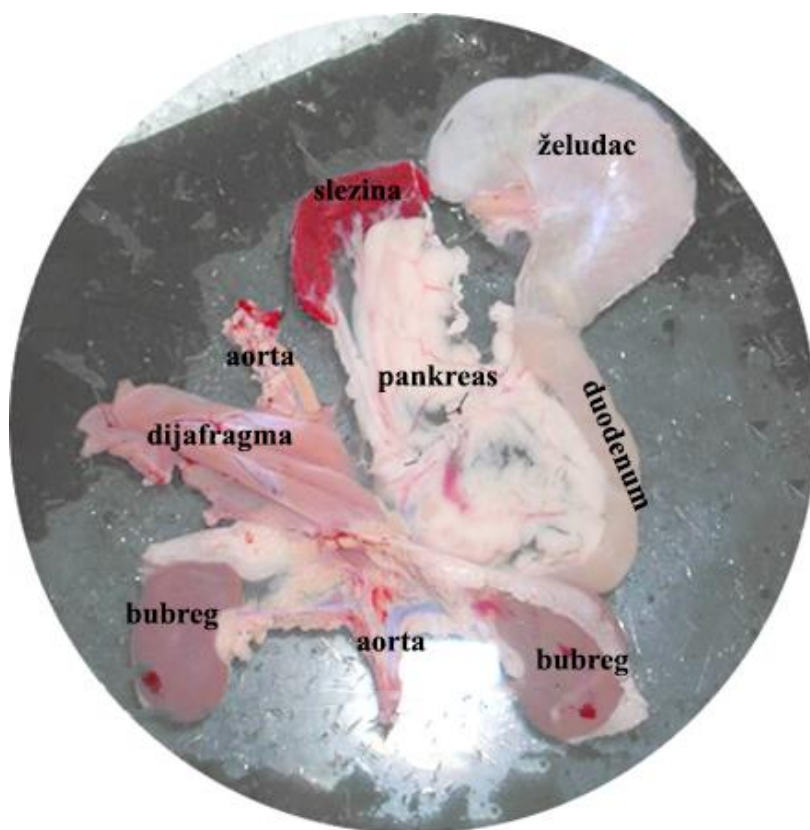
1. UVOD.....	1
1.1. Lokalizacija i anatomija pankreasa.....	1
1.2. Struktura egzokrinog pankreasa	3
1.3. Struktura endokrinog pankreasa	6
1.4. Egzokrino-endokrini odnos	7
1.5. Fiziologija egzokrinog pankreasa.....	12
1.6. Sinteza i sekrecija zimogenih granula	13
1.7. Insulin	15
1.8. Hiperinsulinemija	17
1.9. Fraktalna struktura u biološkim sistemima.....	18
2. CILJ	21
3. MATERIJAL I METODI	22
3.1. Eksperimentalne životinje	22
3.2. Eksperimentalni dizajn tretmana insulinom	22
3.3. Žrtvovanje životinja i izolacija pankreasa.....	23
3.4. Priprema tkiva za svetlosnu mikroskopiju	23
3.5. Bojenje tkiva hematoksilinom i eozinom	23
3.6. Bojenje AZAN.....	24
3.7. Broj mono- i binukleusnih acinusnih ćelija.....	24
3.8. Semi-kvantitativna analiza DNK sadržaja – Feulgen bojenje.....	25
3.9. Fraktalna analiza.....	25
3.10. Imunohistohemijska analiza	27

3.11. Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju	28
3.12. Bojenje polutankih preseka	29
3.13. Morfometrijsko-stereološke analize	29
3.14. Ultrastrukturalna analiza	30
3.15. Dijametar zimogenih granula	31
3.16. Imunocitohemijska analiza	31
3.17. Statistička obrada rezultata	31
4. REZULTATI	33
4.1. Anatomija izolovanih pankreasa	33
4.2. Histološka analiza	34
4.3. Ultrastrukturalna analiza	38
4.4. Fraktalna analiza	39
4.5. Morfometrijsko-stereološke analize	42
4.6. Histohemijske i imunohistohemijske analize	49
4.7. Imunoekspresija amilaze	49
4.8. Feulgen bojenje, imunoekspresija markera proliferacije i sintetska aktivnost binukleusnih acinusnih ćelija	50
5. DISKUSIJA	52
6. ZAKLJUČCI	60
7. LITERATURA	63

1. UVOD

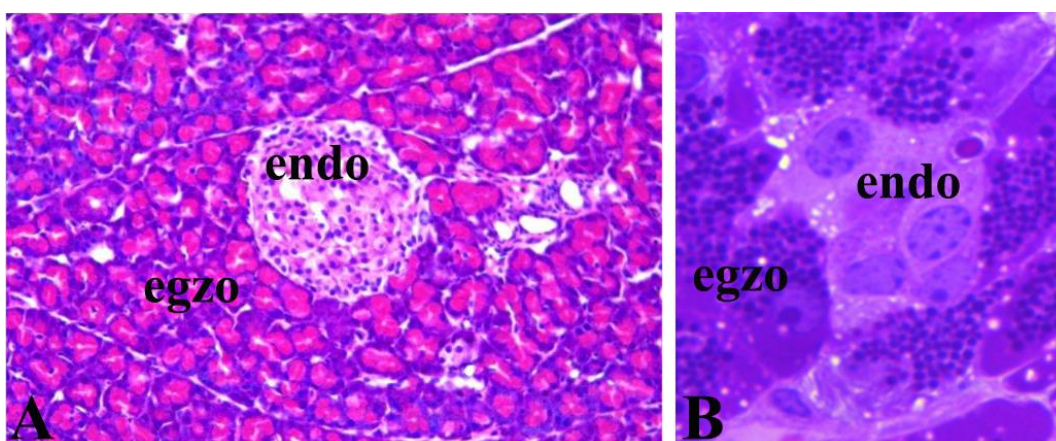
1.1. Lokalizacija i anatomija pankreasa

Pankreas (grč. πάγκρεας, kovanica nastala od reči „pan“ što znači sve i reči „kreas“ što znači meso) je izdužena žlezda bledo-roze do crvenkaste boje pridružena digestivnom sistemu u nivou duodenuma. Tokom embrionalnog razvića pankreas nastaje od evaginacije prednjeg creva. Anatomski je pozicioniran u visceralnom, mezenteričnom belom masnom tkivu, uz želudac, duodenum i slezinu (**Slika 1**). Kao organ pankreas nema jasno definisane anatomske delove, ali se na osnovu vaskulature može podeliti na glavu, vrat, telo i rep. Složenost pankreasa se ogleda u njegovoj histološkoj i funkcijskoj organizaciji.



Slika 1. Izolovan pankreas pacova u originalnoj anatomskej poziciji u visceralnom, mezenteričnom belom masnom tkivu uz želudac, duodenum i slezinu. Uočava se lobularna, režnjevita građa. (Preuzeto i modifikovano iz Schloithe i sar., 2011).

Histološki, pankreas je organizovan kao egzokrini (acinusi) i endokrini (Langerhansova ostrvca), pri čemu su njihova struktura, lokalizacija i procentualna zastupljenost različite (**Slika 2**). Naime, tkivo pankreasa se sastoji od gotovo 95% egzokrinog tkiva i manje od 5% endokrinog tkiva, koje je u vidu usamljenih ostrva ćelija unutar tanke vezivne kapsule (*Kumar i sar., 2005; Chen i sar., 2011*).

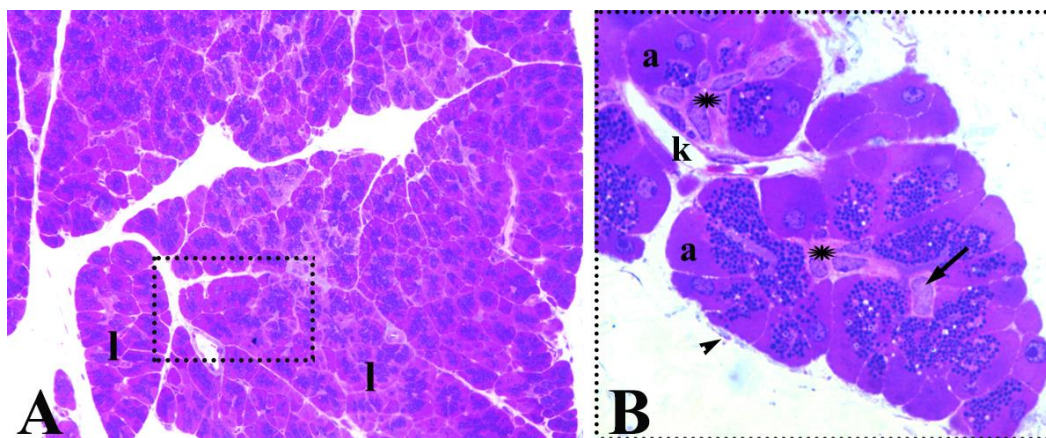


Slika 2. Pankreas pacova, parafinski presek bojen hematoksin/eozin (A) i polutanki presek bojen toluidin plavim (B), posmatran svetlosnim mikroskopom. Endokrini Langerhansova ostrvca (endo) i egzokrini acinusi (egzo). Original, uvećanje: A-x40; B-x100.

Iako se u svim udžbenicima i dalje insistira na podeli pankreasa na dve komponente, endokrinu i egzokrinu, u literaturi postoji i mišljenje o celovitosti organa (*Henderson i sar., 1981*), kako kroz strukturne jedinice, kontinuitet vaskulature i inervacije (*Permyakov i sar., 1973; Williams i Goldfine, 1985; Aughsteen i Mohammed, 2002*), tako i kroz funkcijsku povezanost u normalnoj fiziologiji (*Bareto i sar., 2010*) i patologiji (*Czakó i sar., 2009*).

1.2. Struktura egzokrinog pankreasa

Egzokrini pankreas je serozna žlezda organizovana u lobuse i lobuluse, u okviru kojih se nalaze acinusi (Slika 3A). Egzokrini pankreas izgrađen je od acinusnih i duktalnih ćelija. Acinusne ćelije proizvode digestivne enzime i sekretuju ih u duktuse, izvodne kanale strukturane u nekoliko histoloških nivoa. Acinusne ćelije organizovane su u formi klastera koji su smešteni na najmanjem, terminalnom kraju izvodnog kanala. Svaki acinus je okruglog oblika, izgrađen od 20 do 50 piramidalnih epitelnih ćelija relativno široke baze koja naleže na podepitelijsku laminu i vezivno tkivo (okrenuta ka intersticijumu) i užim apikalnim delom sa vršnim mikroresicama (okrenutim ka lumenu acinusa) (Slika 3B).

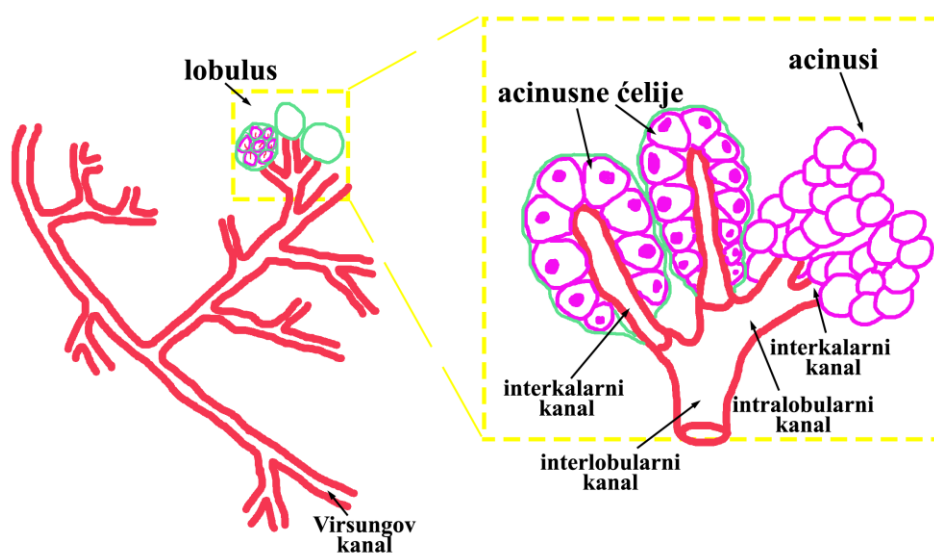


Slika 3. Pankreas pacova, polutanki presek bojen toluidin plavim, posmatran svetlosnim mikroskopom (A). (B) – uvećan deo sa (A). Unutar svakog lobulusa (l) nalazi se veći broj acinusa (a) u čijem centru se nalazi centroacinusna ćelija (→) kojom počinje izvodni kanal (*). Acinusi su odeljeni tankim vezivnim septama (▶) koje polaze sa vezivne kapsule oko pankreasnih lobusa i lobulusa. Između acinusa, duž septi, pružaju se vaskularni (k) i nervni elementi, kao i izvodni kanali. Original, uvećanje: A-x40; B-x100.

Pankreas obavija tanka kapsula vezivnog rastresitog tkiva, sa koje polazi vezivo tkivnih septi između lobulusa. Duž septi pružaju se interlobularni izvodni kanali

(duktusi), krvni sudovi i nervna vlakna autonomnog nervnog sistema. Duktusne ćelije izgrađuju mrežu kanala i sekretuju vodu i bikarbonat. Kanali se organizuju u mrežu sve većih dimenzija, što kulminira glavnim kanalom pankreasa koji se prazni u duodenum (Pandol, 2010; Chen i sar., 2011).

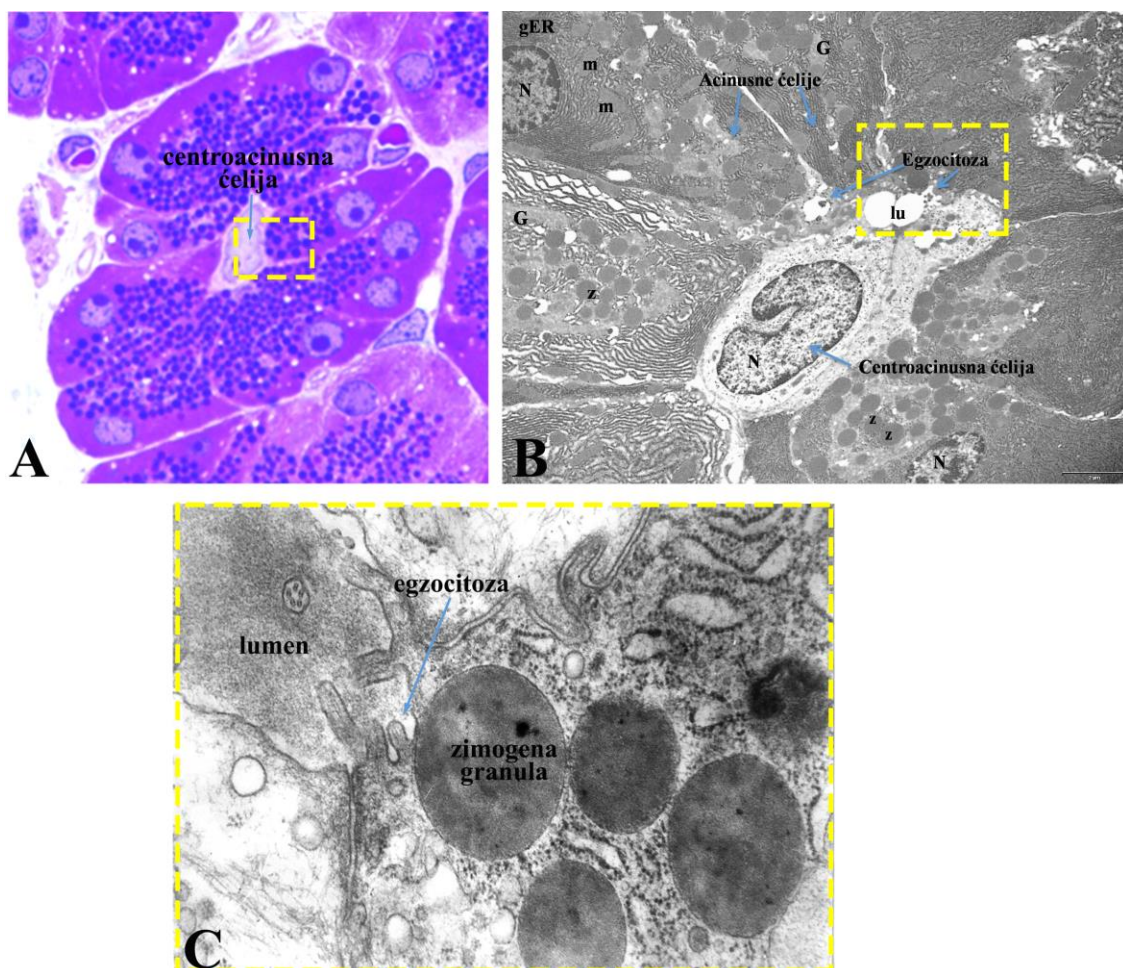
Acinusne ćelije sekretuju digestivne enzime, peptidaze (koje se sintetišu u neaktivnoj formi proenzima, kao što su tripsinogen, himotripsinogen i drugi), α -amilazu, lipaze i nukleaze. Digestivni enzimi pankreasa se aktiviraju tek po izlučivanju u lumen tankog creva.



Slika 4. Shematski prikaz lobulusa, acinusa i sistema izvodnih kanala (duktusa).

Sistem izvodnih kanala pankreasa (**Slika 4**) je veoma specifičan. Početni kanal najmanjeg dijametra, interkalarni kanal, polazi iz unutrašnjosti acinusa i njegove ćelije nalaze se u samoj sredini (odakle potiče i njihov naziv – centroacinusne ćelije), a koje se na polutankim presecima acinusa bojenih toluidin plavim uočavaju kao izrazito svetle sa krupnim, bledim nukleusom (**Slika 5**). Interkalarni kanali nisu samo mehanički prenosnici sadržaja iz acinusnih ćelija. Kuboidalne epitelne ćelije koje oblažu ove

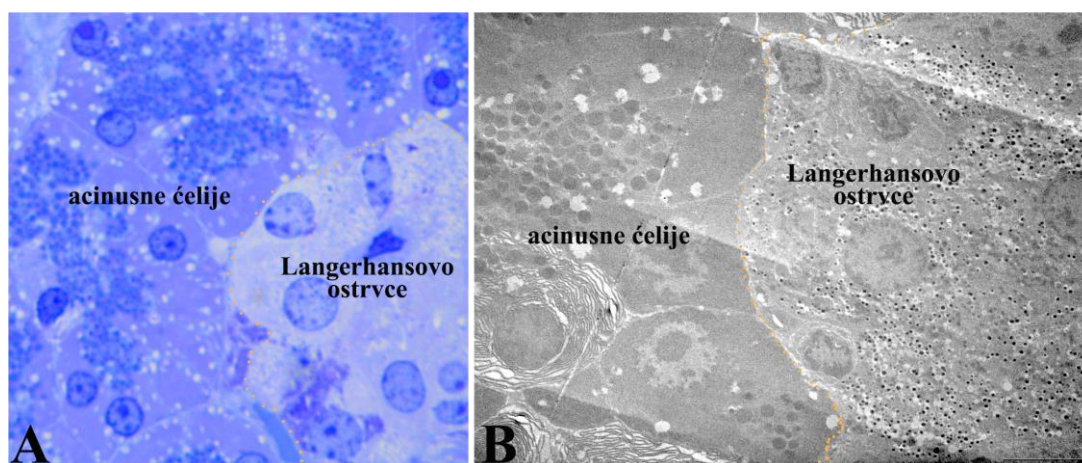
kanale učestvuju u lučenju i transportu vode i bikarbonata, a epitelne ćelije većih kanala stvaraju mucin i tako doprinose povećanju količine pankreasnog soka (Kumar i sar., 2005; Ross i Wojciech, 2011). Više ovih kanala se spaja i obrazuje interlobularni kanal duž vezivno-tkivnih septi između lobulusa. Interlobularni kanali se ulivaju u Virsungov kanal (glavni kanal pankreasa), koji se proteže čitavom dužinom pankreasa, postepeno povećavajući dijametar kako se u njega ulivaju dodatni interlobularni kanali i vodi ka duodenumu (Ross i Wojciech, 2011).



Slika 5. Ultrastruktura acinusa (A), acinusne i centroacinusne ćelije (B) i sekrecija (egzocitoza zimogene granule) u lumen interkalarnog kanala. N – nukleus, gER – granulirani endoplazmin retikulum, G – Goldžijev kompleks, m – mitohondrije, z – zimogene granule, lu – lumen acinusa. Originali, uvećanje: x40, svetlosna mikroskopija; uvećanje: x5.000 (B), x10.000 (C), transmisiona elektronska mikroskopija.

1.3. Struktura endokrinog pankreasa

Endokrini pankreas je difuzan organ, koga čine sferične ćelijske grupacije nazvane Langerhansova ostrvca. Ostrvca se nalaze u svim delovima organa, a najviše u repnom delu pankreasa. Mogu biti izgrađena od par do nekoliko stotina ćelija i dijametar im se u proseku kreće od 100-200 μm . Poligonalne endokrine ćelije organizovane su u vidu kratkih nepravilnih traka između kojih se nalazi gusta mreža fenestrovanih kapilara (Ross i Wojciech, 2011). Ostrvca su tankim slojem retikularnih vlakana odvojena od okolnog egzokrinog pankreasa. Ćelije ostrvca direktno u krv sekretuju hormone, koji prevashodno regulišu metabolizam ugljenih hidrata.



Slika 6. Ultrastruktura Langerhansovog ostrvca, polutanki presek bojen toluidin plavim (A) i tanki presek (B). Endokrine ćelije su izrazito svetle, poligonalne; uočavaju se sitne granule glukagona u α ćelijama. Originali, (A) uvećanje: $\times 40$, svetlosni mikroskop; (B) uvećanje: $\times 5.000$, transmisioni elektronski mikroskop.

Langerhansovo ostrvce izgrađeno je od četiri specijalizovana tipa ćelija: β (insulin), α (glukagon), δ (somatostatin) i PP (pankreasni polipeptid). Proporcija endokrinih ćelijskih tipova se menja u toku života. β ćelije su najbrojnije i nalaze se u centralnom regionu ostrvca, dok ostali tipovi ćelija zauzimaju perifernu poziciju. Njihov

raspored u okviru ostrvca precizno je utvrđen. Najbrojnije su β ćelije i čine 68% ukupnog endokrinog tkiva žlezde, sledeće po zastupljenosti su α ćelije sa 20%, δ ćelije sa 10% i PP ćelije sa 2%. Sve ove ćelije imaju ultrastrukturnu organizaciju koja odgovara protein-sekretujućim ćelijama, ali granulisani endoplazmin retikulum (grER) ipak nije tako dobro razvijen kao kod acinusnih ćelija. Uz Goldži kompleks koji je smešten uz nukleus, najupadljivije organele su svakako sekretne granule (*Kumar i sar., 2005; Chen i sar., 2011*).

Insulin je peptidni hormon koji se sintetiše u β ćelijama. Najvažniji efekat insulina je održavanje normalnog nivoa glukoze u krvi, njenim transportom u ciljne ćelije. Insulin učestvuje u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina, a kroz svoje trofičke efekte promoviše deljenje i rast ćelija. Glukagon je hormon koji se sintetiše u α ćelijama i uključen je u regulaciju nivoa glukoze u krvi. Sekretuje se kada je smanjena koncentracija glukoze u krvi. Glukagon preko svog glikogenolitičkog efekta na hepatocite povećava koncentraciju glukoze u krvi. Kada se istroše rezerve glikogena, glukagon može povećati glukoneogenezu (*Guyton i Hall, 2003; Ross i Wojciech, 2011*). δ ćelije sintetišu somatostatin koji suprimira oslobađanje insulina i glukagona. Pankreasni polipeptid sintetiše se u PP ćelijama i ostvaruje brojne efekte u gastrointestinalnom traktu: stimulacija sekrecije želudačnih i crevnih enzima, inhibicija crevne peristaltike (*Guyton i Hall, 2003; Ross i Wojciech, 2011*).

1.4. Egzokrino-endokrini odnos

Oba dela pankreasa su podjednako aktivna u varenju i metabolizmu hrane, kroz sekreciju digestivnih enzima iz egzokrinog dela i hormona iz endokrinog dela pankreasa i zbog toga ovaj organ ima značajno mesto u metabolizmu i njegovim

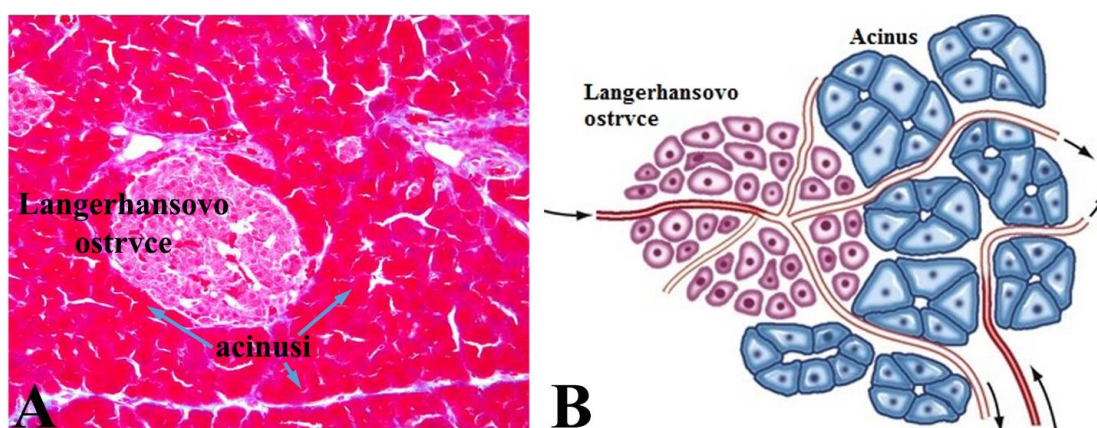
poremećajima. Digestivni enzimi pankreasa se sintetišu i sekretuju u velikoj količini tako da je struktura acinusnih ćelija u potpunosti podređena transkripcionoj i translatornoj aktivnosti.

Funkcijska jedinica egzokrinog pankreasa je sam acinus, jer se stimulacijom jedne acinusne ćelije impuls prenosi kroz sve acinusne ćelije unutar jednog acinusa, ali ne i na susedne acinuse. Neki naučnici ovaj pojam proširuju pa se kao strukturno-funkcionalna jedinica egzokrinog pankreasa označava strukturna udruženost kapilar-acinus-mali izvodni kanal. Tumačenje se zasniva na shvatanju da sinteza enzima za varenje hrane ne može da otpočne ukoliko se peptidni hormoni, nošeni krvotokom do acinusnih kapilara, ne vežu za receptore na bazalnoj strani membrane acinusnih ćelija.

Blizak morfološki odnos omogućava funkcionalne interakcije, ali sam način sadejstva između egzokrinog i endokrinog pankreasa nije u potpunosti razrešen. Za sada je poznato da se posredovanje između egzokrinog i endokrinog pankreasa vrši preko niza hormona koje luče Langerhansova ostrvca i neurotransmitera. Ostrvca sintetišu i izlučuju brojne hormone: insulin, glukagon, somatostatin i pankreasni polipeptid. Vodeću regulatornu ulogu među njima ima insulin (*Slack, 1995; Motta i sar., 1997; Grapin-Botton i sar., 2001; Barreto i sar., 2010*).

Insulin ostvaruje različite biološke efekte, od kojih je napoznatija regulatorna uloga u metabolizmu glukoze i lipida, sinteza proteina i rast, deoba i preživljavanje ćelija (*Rhodes i White, 2002; Wilcox, 2005*). Na osnovu eksperimenata na laboratorijskim životinjama može se zaključiti da insulin ima trofički i sekretorni efekat na egzokrini pankreas (*Pap, 2004; Barreto i sar., 2010; Ashcroft i Rorsman, 2012; Cerf i sar., 2012*). Pankreas je izuzetno dobro vaskularizovan. Ranije anatomske studije su ukazale na postojanje portnog sistema krvnih sudova koji direktno acinuse snabdeva

krvlju iz Langerhansovih ostrvaca (**Slika 7**). Acinusi locirani bliže portnom sistemu (periinsularni) su veći i proizvode više enzima nego oni koji su udaljeniji (*Williams i Goldfine, 1985; Pap, 2004*). Digestivni enzimi se skladište u zimogenim granulama acinusnih ćelija i njihovo oslobađanje putem egzocitoze stimulisano je neurohumoralno. Takođe, egzogeni i endogeni insulin mogu stimulisati sintetske i sekretorne procese u acinusnim ćelijama (*Slack, 1995; Pandol, 2010*).



Slika 7. Bliska anatomsko, histološka i funkcijska veza egzokrinog (acinusa) i endokrinog (Langerhansovog ostrvca) pankreasa. (A) AZAN bojenje, svetlosna mikroskopija. Original, uvećanje x40; (B) shematski prikaz. (Preuzeto i modifikovano iz Goldfine i Williams, 1983).

Pored toga, brojne studije su ukazale na postojanje direktnog (preko insulinskih receptora) i indirektnog (uticaj na mehanizam holecistokinina) efekta insulina na acinusne ćelije (*Bertelli i Bendayan, 1997; MacDonald, 2011*). Acinusne ćelije imaju receptore visokog afiniteta za insulin preko kojih reguliše sintezu digestivnih enzima i broj holecistokininskih receptora. Takođe, veruje se da egzogeni insulin, kao trofički faktor, reguliše održavanje nivoa tkivne amilaze u acinusima (*Bani i sar., 1989; Williams, 2010; Mehran i sar., 2012*).

Hormoni Langerhansovih ostrvaca regulišu pankreasnu egzokrinu funkciju na više specifičnih načina. Insulin ima stimulatorno dejstvo na biosintezu amilaze, delujući

preko insulinskih receptora koji se nalaze na bazolateralnoj strani membrane acinusnih ćelija. Sa druge strane, glukagon ima inhibitorno dejstvo i može dovesti do atrofije acinusa. Somatostatin pak, ima parakrino (lokalno) inhibitorno dejstvo na lučenje enzima pankreasa. Slično inhibitorno dejstvo na egzokrini pankreas ostvaruje i pankreasni polipeptid (*Pap, 2004; Barreto, 2010*).

Kao posledica bliskih anatomskih i funkcionalnih veza između egzokrinog i endokrinog pankreasa svaki poremećaj jednog od ovih delova neminovno će uticati na drugi. Tako, patofiziološka stanja egzokrinog pankreasa povezana su sa strukturnim i funkcijskim promenama ostrvaca i mogu se odražavati čak na njihov sekretorni kapacitet endokrinih ćelija (*Saito i sar., 1980; Bani i sar., 1989; Pap, 2004*). Tkivna insulinska rezistencija dovodi do degenerativnih komplikacija u mnogim organima, uključujući bubrege, srce, mišiće, oči. Insulinska rezistencija se definiše kao stanje smanjenog metaboličkog odgovora ciljnih ćelija ili čitavog organizma na normalne koncentracije insulina. Insulinska rezistencija i kompenzatorna hiperinsulinemija dovode se u vezu sa nizom metaboličkih poremećaja pod zajedničkim nazivom metabolički sindrom ili sindrom X (hipertenzija, dijabetes tipa 2, dislipidemija, kardiovaskularna oboljenja, gojaznost, netolerancija glukoze, policistični jajnici, karcinomi, ubrzano starenje) (*Rhodes i White, 2002; Cordain i sar., 2003; Wilcox, 2005; Shanik i sar., 2008; Corkey, 2012; Samuel i Shulman, 2012*). Većina studija ispituje uticaj insulina na fiziološke procese, sekreciju i distribuciju receptora u tkivu (*Cerf i sar., 2006; Johnson i Alejandro, 2008; Gonzalez i sar., 2011; Yang i sar., 2014*). I dalje je nepoznanica ima li insulin uticaja na (mikro)arhitekturu egzokrinog pankreasa.

Iako se tradicionalno razmatraju kao posebni entiteti, egzokrini i endokrini pankreas ostvaruju složenu anatomsku i funkcionalnu interakciju u okviru insulo-

acinusne ose. Naime, egzokrini deo pankreasa je pod uticajem endokrinog pankreasa, ne samo sistemski kao ostale ćelije, već i direktno, preko veze portnog sistema Langerhansovih ostrvaca. Poznato je da je periinsularni deo pankreasa veći, da acinusi oko ostrvaca sadrže mnogo više zimogena i amilaze od teloinsularnih. U literaturi je prilično kontraverzno pitanje međusobnog odnosa egzokrinih acinusa i glavnih hormona endokrinog pankreasa: insulina, glukagona, somatostatina i pankreasnog polipeptida. Naime, za glukagon je dokazano da *in vivo* inhibira, a *in vitro* stimuliše sekreciju enzima egzokrinog pankreasa pasa i pacova. Slično je pokazano i za pankreasni polipeptid, uz dodatak da on stimuliše i sintezu DNK u nukleusima acinusnih ćelija. Receptori za somatostatin su prisutni na membrani acinusnih ćelija i smatra se da on preko njih inhibira i bazalnu i stimulisanu sekreciju enzima (*Williams i Goldfine, 1985; Pap, 2004*).

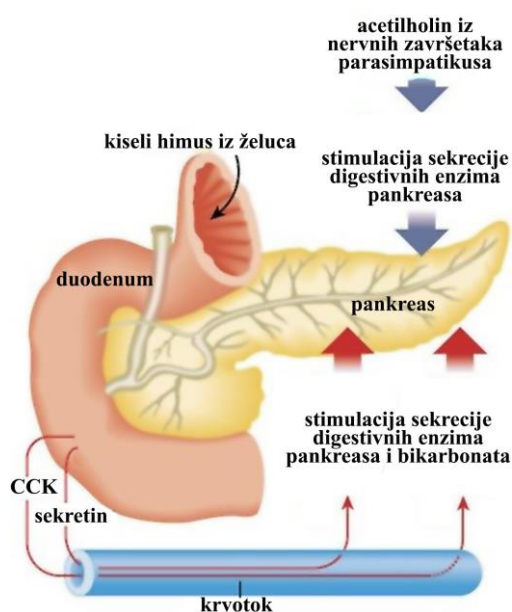
Čini se da najznačajniju ulogu među njima ostvaruje ipak insulin, s obzirom da je pokazano da i endogeni i egzogeni izazivaju povećanu sintezu pankreasnih enzima u acinusima, a time i njihov rast. Dokumentovana je uloga insulina u regeneraciji egzokrinog pankreasa u pankreatitisu kod čoveka, ali su podaci iz literature i dalje u velikoj meri kontradiktorni. Poseban problem predstavljaju nestandardizovane metode za praćenje histoloških promena pankreasa van histopatologije, čime se ograničava prepoznavanje ranih i značajnih promena. Sa druge strane, hipoinsulinemija u animalnim modelima izaziva atrofiju egzokrinog pankreasa i njegovu zamenu masnim tkivom (*Pap, 2004*).

Insulo-acinusna osa je od posebnog interesa u etiologiji dijabetesa. Naime, kod dijabetičnih pacova nakon izazivanja dijabetesa streptozotocinom (bez pankreatitisa), pokazan je pad amilaze i povećanje tripsinske aktivnosti. Takođe, kod ljudi obolelih od

dijabetesa tipa 2 pokazano je nuklearno-magnetnom rezonancom da dolazi do značajnog smanjenja volumena pankreasa na račun atrofije upravo egzokrinih acinusa. Ovi podaci su veoma značajni jer ukazuju na narušavanje homeostaze u okviru insulo-acinusne ose, ali je još uvek nejasno da li i u kojoj meri doprinose molekulskim promenama na nivou sinteze insulina, količine β ćelija pankreasa i/ili specifične arhitekture egzokrinog pankreasa (Barreto i sar., 2010).

1.5. Fiziologija egzokrinog pankreasa

Sekrecija pankreasa je pod hormonalnom i neuralnom kontrolom. Ulaz kiselog himusa iz želuca u duodenum stimuliše oslobađanje dva gastrointestinalna hormona, sekretina i holecistokinina (CCK). Sekretin stimuliše ćelije interkalarnih kanala da sekretuju tečnost sa bikarbonatom koji neutrališe kiselost himusa kako bi se uspostavila pH vrednost optimalna za aktivnost pankreasnih enzima u duodenumu (Slika 8).



Slika 8. Regulacija sekrecije egzokrinog pankreasa. CCK-holecistokinin (Preuzeto i modifikovano iz Gunstream 2018).

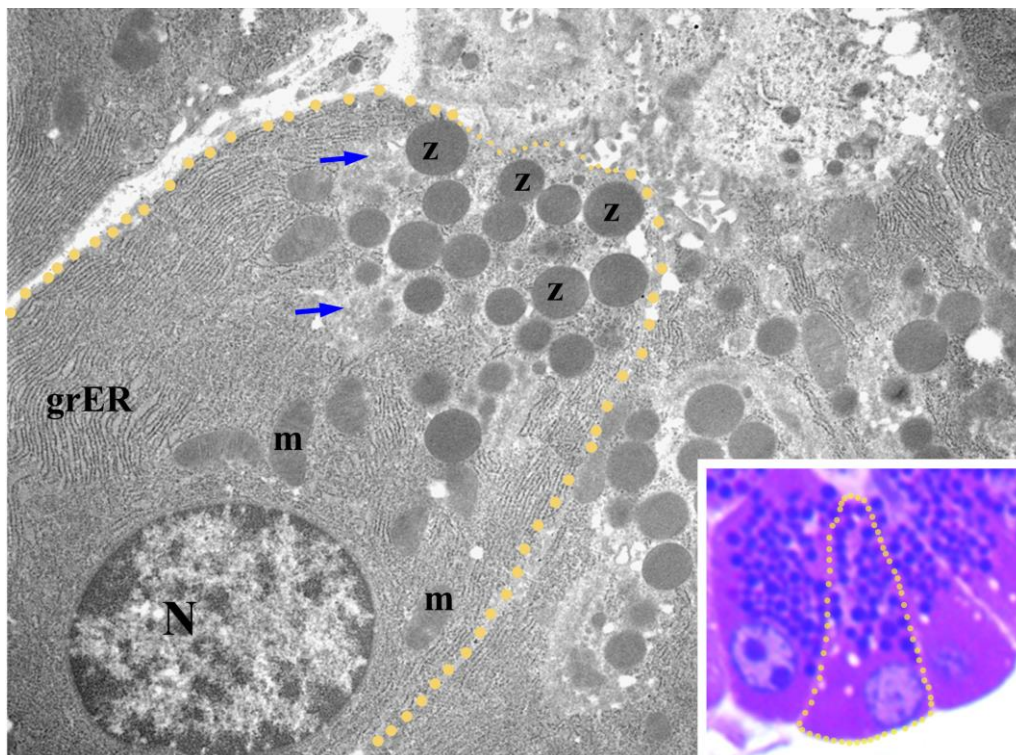
Vezivanjem holecistokinina za receptore na bazolateralnoj membrani acinusnih ćelija stimuliše se oslobađanje digestivnih enzima. S obzirom da je strukturno sličan holecistokininu i da je dokazano da interreaguje sa jednom kategorijom njegovih receptora, moguće je da je u ovu stimulaciju uključen i gastrin.

Neuralna kontrola ostvaruje se putem nervnih ganglija koje su specifično anatomski smeštene u interlobularnim regionima pankreasa. Nervni završeci postganglijskih neurona direktno inervišu acinusne ćelije. Lučenjem acetilholina moguće je izazvati stimulaciju acinusnih ćelija. Poput sekretina i holecistokinina, acetilholin koji se oslobađa iz nervnih završetaka parasimpatičkog nerva vagusa i drugih holinergičkih nerava enteričkog nervnog sistema spada u osnovne stimulatore sekrecije pankreasa. Međutim, smatra se da hormonalna regulacija sekrecije pankreasa dominira u odnosu na neuralnu (*Ross i Wojciech, 2011*).

1.6. Sinteza i sekrecija zimogenih granula

Acinusne ćelije sintetišu i sekretuju brojne enzime za varenje proteina, lipida, ugljenih hidrata i drugih komponenti hrane. Kako bi se zaštitio integritet samog pankreasa, enzimi se stvaraju u formi neaktivnih proenzima kao što su tripsinogen, himotripsinogen, prokarboksipeptidaza. Amilaza i lipaza su izuzeci i izlučuju se u aktivnom obliku direktno u centralno pozicioniran lumen acinusa, odakle sistemom kanala dospevaju do duodenuma. Tako se enzim tripsin sintetiše u formi tripsinogena, koji se aktivira tek u duodenumu. Kao dodatni mehanizam zaštite, u granulama acinusnih ćelija nalazi se i inhibitor tripsina, protein koji se sintetiše istovremeno sa digestivnim enzimima (*Guyton i Hall, 2003*). Na poliribozomima grER acinusnih ćelija sintetišu se brojni sekretorni proteini (digestivni enzimi) čija se dalja obrada odvija na

nivou Goldži kompleksa. Nakon obrade, sekretorni proizvodi privremeno se skladište u zimogenim granulama (**Slika 9**).



Slika 9. Organele acinusne ćelije (oivičeno žutim isprekidanim linijama) uključene u sintezu i sekreciju. N – nukleus, m – mitohondrija, grER – granulirani endoplazmin retikulum, z – zimogene granule, Goldži kompleks (→). Original, polutanki presek bojen toluidin plavim – inset, uvećanje x100, svetlosna mikroskopija; uvećanje x8.000, transmisiona elektronska mikroskopija.

Na presecima pankreasa bojenim hematoksilinom i eozinom (**Slika 2A**) može se uočiti da je apikalna citoplazma acinusnih ćelija eozilofilna sa finom granulacijom usled akumulacije zimogenih granula, a bazalna citoplazma bazofilnija zahvaljujući grER i slobodnim ribozomima. Na polutankim presecima bojenim toluidin plavim (**Slika 9 – inset**) jasno se uočavaju granule različitog dijametra u apikalnom delu acinusnih ćelija. Na elektronskim mikrografijama (**Slika 9**) možemo uočiti da se granule formiraju u i neposredno iznad oblasti Goldžijevog kompleksa, smeštenog iznad nukleusa. Nukleus acinusnih ćelija se jasno uočava u bazalnom delu ćelije.

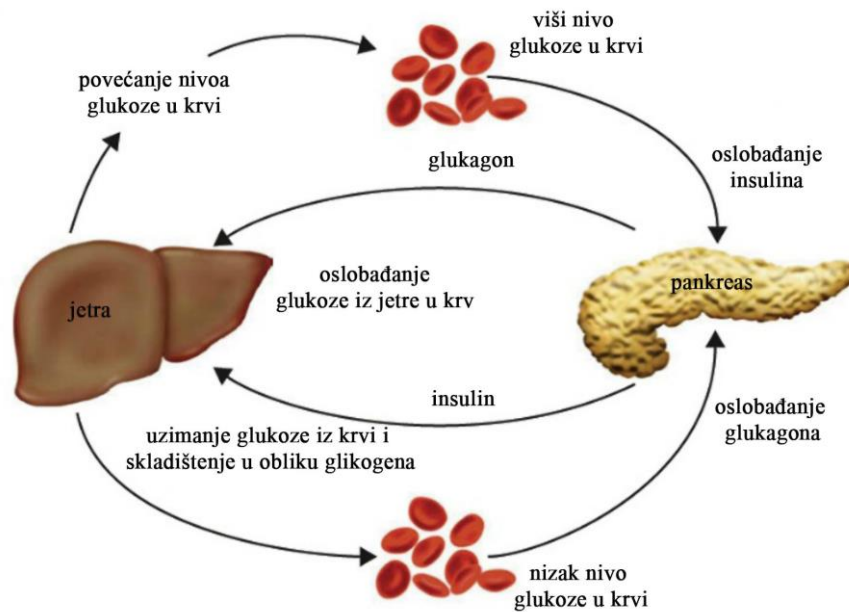
1.7. Insulin

Glukoza koja nastaje u digestivnom traktu koristi se kao izvor energije u metaboličkim procesima u celom telu. Hormoni svih glavnih tipova ćelija Langerhansovih ostrvaca uključeni su u regulaciju nivoa glukoze u krvi.

Insulin je polipeptidni hormon pankreasa i spada u grupu centralnih hormona koji sadejstvuje sa skoro svim ostalim hormonima i na taj način kontroliše sve metaboličke i fiziološke procese u organizmu. Insulin utiče na širok opseg fizioloških procesa, iako je najpoznatiji po regulatornoj ulozi u homeostazi glukoze. Sintetiše se u formi prekursora, preproinsulina na poliribozomima granulisanog endoplazminog retikuluma. Posle odvajanja kratke signalne sekvence u cisterni granulisanog endoplazminog retikuluma nastaje proinsulin, koji se u vidu malih vezikula transportuje ka kompleksu Goldži gde se odvija finalna konverzija (*Pap, 2004; Wilcox, 2005*).

Insulin reguliše nivo glukoze u krvi, odnosno omogućava njen ulazak iz cirkulacije u ćeliju. Deluje dvojako, podstiče proliferaciju ćelija – štiti ih od ćelijske smrti ili ih uvodi u ćelijsku smrt. Takođe, podstiče remodeliranje zdravog i ubrzava rast kancerski izmenjenih tkiva. Insulin lokalno utiče na rast i egzokrinu sekreciju pankreasa.

Povišen nivo glukoze u krvi stimuliše sekreciju insulina. Insulin omogućava transport glukoze iz krvi u ćelije, gde se ona ili iskoristi za dobijanje energije ili se u ćelijama jetre čuva kao energetska rezerva u formi glikogena. Kada je nivo glukoze u krvi nizak (**Slika 10**) luči se hormon glukagon. Glukagon dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi tako što stimuliše razlaganje glikogena u jetri (*Pap, 2004; Wilcox, 2005*).



Slika 10. Regulacija koncentracije glukoze u krvi pankreasnim hormonima (Preuzeto i modificirano iz Kaidanovich-Beilin i sar., 2012).

Kada insulin ne može da obezbedi ulazak glukoze u ćelije, ili kada insulina nema dovoljno, nivo glukoze raste i nastaje dijabetes. Ukoliko su ćelije rezistentne na unos glukoze, pankreas luči više insulina kako bi obavio svoju funkciju, pa se kao posledica javlja hiperinsulinemija. Posledica hiperinsulinemije je da se pankreas metabolički iscrpljuje, vremenom slabi i prestaje njegova funkcija i razvija se dijabetes tipa 2. Hiperinsulinemija se danas smatra predijabetičnim stanjem i često se označava dijabetesom tipa 3.

Kao odgovor na lučenje gastrointestinalnih hormona (holecistokinin, sekretin) i neurotransmitera, insulin ima kratkoročni efekat na stimulaciju sekrecije pankreasa i dugoročni efekat na regulaciju sinteze digestivnih hormona (Williams i Goldfine, 1985).

Nekoliko istraživanja s kraja prošlog veka je potvrdilo hipotezu da insulin ostvaruje trofički efekat na tkivo egzokrinog pankreasa. Veći deo regulacije se ogleda u direktnom lokalnom delovanju na acinusne ćelije da sintetišu digestivne enzime i na

duktusne ćelije da luče bikarbonate, ali i indirektnom (uticaj na mehanizam holecistokinina) efektu insulina (*Pap, 2004*). Naime, kod dijabetičara se mogu zapaziti promene u morfologiji i disfunkcija egzokrinog pankreasa koje možemo objasniti jakim lokalnim trofičnim efektom insulina.

Druge studije osporavaju ovu hipotezu s obzirom da ne objašnjava zašto se kod oko 50% pacijenata sa dijabetesom tipa 1, kao i kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 kod kojih ne postoji lokalni nedostatak insulina, bar ne na početku bolesti, ne uočavaju nikakve promene u egzokrinom pankreasu (*Löhr i Klöppel, 1987; Hardt, 2011*).

Drugo objašnjenje može biti da su funkcijske i morfološke promene u egzokrinom pankreasu posledica dijabetične neuropatije, a da je dijabetes melitus posledica osnovnih bolesti pankreasa kao što je hronični pankreatitis.

1.8. Hiperinsulinemija

Hiperinsulinemija je stanje u kome postoji viši nivo cirkulišućeg insulina nego što se to očekuje u odnosu na nivo glukoze u krvi. To može biti posledica raznih metaboličkih poremećaja. Hiperinsulinemija prati različita oboljenja, počevši od dijabetesa tipa 2 i gojaznosti, preko kardiovaskularnih i koronarnih oboljenja, do karcinoma, Alchajmerove bolesti, sindroma policističnih jajnika, osteoporoze i ubrzanog starenja, pa se zato smatra da to nije uzrok već samo jedan od simptoma bolesti. Hiperinsulinemija je povezana sa hipertenzijom, gojaznošću, dislipidemijom i intolerancijom na glukozu, što je poznato kao metabolički sindrom (*Shanik, 2008*).

Ova bliska veza između hiperinsulinemije i metaboličkog sindroma sugerise srodne ili zajedničke mehanizme patogeneze. Insulin ima regulatornu ulogu u transportu katjona preko ćelijske membrane. Povišen nivo insulina, kao što je u slučaju kod

hiperinsulinemije, dovodi do porasta koncentracije natrijuma i snižene unutarćelijske koncentracije kalijuma, što doprinosi hipertenziji. U dijabetesu tipa 2 ćelije postaju “otporne” na dejstvo insulina, što može voditi razvoju insulinske rezistencije. Takva smanjena senzitivnost receptora za insulin takođe može dovesti do povišenja njegove koncentracije u krvi, odnosno hiperinsulinemije. Sa smanjenim odgovorom perifernih tkiva (jetra, mišići) na insulin, β ćelije pankreasa povećavaju lučenje insulina kao odgovor i na konstantno visok nivo glukoze u krvi. Istraživanja su pokazala da je visok nivo insulina rezultat i insulinske rezistencije, što može dovesti do hipoglikemije ili dijabetesa, povećanog rizika od sindroma policističnih jajnika (PCOS), povećane sinteze lipidnih partikula vrlo niske gustine (VLDL), hipertenzije, koronarnoarterijske bolesti, povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti, gojaznosti i letargije (Wilcox, 2005; Shanik, 2008).

1.9. Fraktalna struktura u biološkim sistemima

Jedna od karakteristika bioloških oblika i sistema je njihova složenost, a metode objektivizacije ove činjenice su predmet istraživanja različitih disciplina prirodnih nauka. Primeri fraktalnosti, odnosno, nepravilnosti, iregularnosti u biljnom i životinjskom svetu postoje od najmanje gradivne jedinice organizma do kompleksnih anatomskih struktura celog organizma. Dva osnovna pojma u fraktalnoj geometriji na kojima ona počiva su pojmovi samo-sličnosti i dimenzionalnosti. Fraktali su geometrijski oblici čija je fraktalna dimenzija uvek veća od topološke dimenzije. Pojam “fraktal” izveden je iz latinske reči *fractus*, što znači „slomljen“, „nepravilan“ ili „iregularan“. Fraktalna geometrija je relativno mlad koncept koji je formulisao Benoit Mandelbrot sedamdesetih godina 20. veka i ona je u godinama koje slede dobila

značajno mesto u matematici, a naročito u primenjenim prirodnim naukama (*Mandelbrot, 1982; Budimlija, 1998; Letić i Živković, 2014*). Osnovni koncept fraktalne geometrije zasniva se na činjenici da većina oblika u prirodi ne podleže principima klasične (Euklidove) geometrije već su relativno nepravilni. Fraktalna dimenzija je vrednost koja pruža uvid u kojoj meri neki fraktal ispunjava prostor u kome se nalazi. Za fraktalne strukture koje nisu dobijene strogo definisanim pravilima ne može se odrediti dimenzija samosličnosti, već se primenjuju druge metode (*West, 2010; Gonzales i sar., 2011; Metze, 2013; Pantić i sar., 2013*).

Najčešće primenjivan metod u fraktalnoj analizi je BC (*eng. box-counting*) metod prebrojavanja boksova, uveden od strane Russel i saradnika (*1980*).

Fraktalna dimenzija je samo jedan od alata u fraktalnoj analizi, koja daje indeks kapaciteta posmatranog fraktalnog objekta da popuni prostor u kojem se nalazi. Međutim, ona ne daje informaciju o obrascu popunjavanja. Mandelbrot je kao rešenje predložio jednu drugu dimenziju koja se naziva lakunarnost (*lacuna* – lat. praznina, rupa, jezero) (*Mandelbrot, 1982*). Lakunarnost se može shvatiti kao mera dubinske neravnomernosti teksture posmatranog objekta. Što je veća dubina, veća je lakunarnost.

Fraktalna dimenzija je u stanju da prevodi oblik kompleksnosti u analitičke kvantitativne podatke, usklađujući jaz između strukturnih karakteristika i funkcionalnih kvantitativnih mera, što omogućava otkrivanje suptilnih morfoloških promena (*Sirri i sar., 2014*). Fraktalna dimenzija je mera geometrijske kompleksnosti tkiva, a lakunarnost je mera nehomogenosti tkiva (*Jo i sar., 2013, Pantić i sar., 2013*). Nedavne studije pokazale su da je kompjuterska analiza mikroskopske slike objektivna i reproduktivna metoda za dijagnostiku i prognostičku svrhu (*Bizzarri i sar., 2011; Fero i sar., 2011; Di Leva i sar., 2012; Gheonea i sar., 2014; Al-Marabeh i sar., 2016*).

Termin fraktal uveden je u cilju karakterizacije prostornih ili vremenskih fenomena koji su kontinualne, ali nediferencijabilne funkcije. Uticaj egzogenog insulina na morfologiju egzokrinog tkiva pankreasa može biti analiziran na više načina, pogotovo sa stanovišta fraktalne analize.

2. CILJ

Cilj ovog istraživanja jeste rasvetljavanje histoloških promena egzokrinog pankreasa i ultrastrukturnih promena acinusnih ćelija tokom remodeliranja, indukovanog insulinom.

Postojanje insulo-acinusne ose svedoči da egzokrini pankreas lokalno reaguje na periportalni nivo insulina strukturnim (ćelijsko/tkivnim) i funkcijskim promenama i da je prisustvo insulina neophodno za sintezu enzima i formiranje zimogenih granula. Međutim, šta se dešava kada se davanjem insulina akutno ili hronično, sistemski povećava njegova koncentracija u krvi, da li se i kako se to odražava na egzokrini pankreas i u kojoj meri se histološka slika i ćelijska arhitektura acinusa menja? Da li se ona može kvantifikovati i u kojoj meri kvantitativne promene oslikavaju početne promene na osnovu kojih se može predvideti stepen oštećenja pankreasa i razvoj dijabetesa?

Stepen insulo-acinusne interakcije je visok i kompleksan u fiziološkom, a pogotovo u patološkom stanju, stoga je neophodno istraživati i standardizovati histološke i citološke promene acinusa izazvane insulinom.

Polazeći od ovih osnova, postavljena je eksperimentalna studija koja bi trebalo da korišćenjem metoda svetlosne i transmisionne elektronske mikroskopije, imunohistohemije, morfometrijske i fraktalne analize, pomogne u rasvetljavanju:

- morfoloških promena nastalih u tkivu egzokrinog pankreasa i pruži detaljniji uvid u histološku građu pankreasa i acinusnu arhitekturu koja leži u osnovi tih promena;
- uloge uočenih promena u dualnom efektu insulina na acinuse, trofičkom i atrofičkom;
- efekta egzogenog insulina na fraktalnu strukturu egzokrinog pankreasa;
- ultrastrukturnih promena, sintetske i sekretorne aktivnosti u acinusnim ćelijama pankreasa.

3. MATERI JAL I

METODI

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja stari dva meseca. Eksperimentalne životinje, telesne mase od 190 do 260 g, merene su po odvajanju u kavez. Životinje su bile prilagođene dnevno-noćnom režimu od 12 sati svetlosti i 12 sati mraka i u uslovima konstantne vlažnosti sa temperaturom 22 ± 1 °C. Imale su pristup česmenskoj vodi i briketiranoj hrani *ad libitum*. Sve navedene procedure na životinjama su urađene u skladu sa EEC direktivom 86/609/EEC, odnosno EU direktivom 2010/63/EU, a odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa životinjama Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2. Eksperimentalni dizajn tretmana insulinom

Životinje su podeljene u šest grupa: dve kontrolne, injicirane fiziološkim rastvorom i četiri ekperimentalne, injicirane insulinom (Mixtard® 30, NovoNordisk, Danska) intraperitonealno (i.p.) 1 dan (akutno) ili 3 dana (hronično). Korišćene su dve doze insulina, niska (0.4 IU/kg telesne mase) i visoka (4 IU/kg telesne mase) (Tabela 1).

Tabela 1. Eksperimentalne životinje i primenjeni tretmani.

	Kontrola	Insulin	
Akutno (1 dan)	Fiziološki rastvor 1 ml/kg telesne mase, <i>i.p.</i> 1x dnevno 6 životinja	Insulin (Mixtard® 30) 0.4 IU/kg telesne mase, <i>i.p.</i> 1x dnevno 6 životinja	Insulin (Mixtard® 30) 4 IU/kg telesne mase, <i>i.p.</i> 1x dnevno 6 životinja
Hronično (3 dana)	Fiziološki rastvor 1 ml/kg telesne mase, <i>i.p.</i> 1x dnevno 6 životinja	Insulin (Mixtard® 30) 0.4 IU/kg telesne mase, <i>i.p.</i> 1x dnevno 6 životinja	Insulin (Mixtard® 30) 4 IU/kg telesne mase, <i>i.p.</i> 1x dnevno 6 životinja

3.3. Žrtvovanje životinja i izolacija pankreasa

Tri časa nakon poslednje injekcije životinjama je izmerena telesna masa, a zatim su žrtvovane dekapitacijom, bez anestezije. Odmah po dekapitaciji izolovan je pankreas, koji je očišćen od masnog i vezivnog tkiva, a potom izmeren. Po merenju pristupilo se metodima pripreme tkiva za svetlosnu i elektronsku mikroskopiju.

3.4. Priprema tkiva za svetlosnu mikroskopiju

Veći deo tkiva pankreasa je u cilju fiksacije odmah potopljen u neutralni 10% puferisani rastvor formalina (4% formaldehid, pH 7.4). Nakon 72 sata, ispiran je u česmenskoj vodi preko noći, dehidratisan kroz seriju etanola rastuće koncentracije, prosvetljen u ksilolu i ukalupljen u parafin. Ukalupljeno tkivo je potom sečeno na rotacionom mikrotomu (Reichert, Austrija) na preseke debljine 5 μm i nanošeno na SuperFrost Plus mikroskopske pločice (Thermo Fisher Scientific, SAD). Preseci su zatim bojeni na odgovarajući način, radi analiziranja na svetlosnom mikroskopu.

3.5. Bojenje tkiva hematoksilinom i eozinom

Za proučavanje opšteg plana građe organa i fraktalnu analizu korišćeni su tkivni preseci pankreasa bojeni hematoksilinom i eozinom. Pre bojenja, tkivni preseci su deparafinisani u ksilolu (dve promene po 5 min), rehidratirani kroz seriju etanola opadajućih koncentracija (od 100% do 70%, po 5 min), do destilovane vode. Zatim su preseci bojeni sveže pripremljenim hematoksilinom, a potom i eozinom. U cilju

dobijanja trajnih preparata uzorci su dehidratirani sprovođenjem kroz 95% i 100% etanol, prosvetljeni u ksilolu i montirani u DPX.

Preseci obojeni hematoksilinom i eozinom posmatrani su na Leica DMLB svetlosnom mikroskopu opremljenim digitalnom kamerom Leica DFC295 (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

3.6. Bojenje AZAN

Za proučavanje opšteg plana građe egzokrinog pankreasa korišćeni su i preseci bojeni AZAN (*skr.* AZokarminANilin plavo) metodom. To je modifikovano trihromno bojenje po Maloriju, pogodno za jasno uočavanje vezivnog tkiva. Preseci tkiva su posle deparafinizacije i rehidratacije bojeni u vodenom rastvoru azokarmina B, kratko diferencirani u anilin alkoholu, izlagani dejstvu štavila (vodeni rastvor fosfovolframske kiseline) i na kraju bojeni u anilin plavo – oranž G vodenom rastvoru. Ova metoda nam omogućava da analiziramo odnose između elemenata tkiva pankreasa, gde se jasno uočavaju acinusi egzokrinog pankreasa obojeni karmin crveno, kolagena vlakna vezivnog tkiva koja se boje izrazito plavo, dok su Langerhansova ostrvca svetlo roze.

3.7. Broj mono- i binukleusnih acinusnih ćelija

Broj mono- i binukleusnih acinusnih ćelija određivan je sa polutankih preseka bojenih metilenskim plavim i baznim fuksinom. Bojenje je vršeno nakapavanjem jednake zapremine metilenskog plavog i baznog fuksina na preseke, uz zagrevanje na grejnoj ploči dva minuta, nakon čega su preseci ispirani u česmenskoj vodi, osušeni i montirani u DPX. Posmatranje, snimanje i brojanje vršeno je na slikama sa Leica

DMLB svetlosnog mikroskopa. Brojano je po 50 ćelija iz svake grupe sa 10 nasumično izabranih polja.

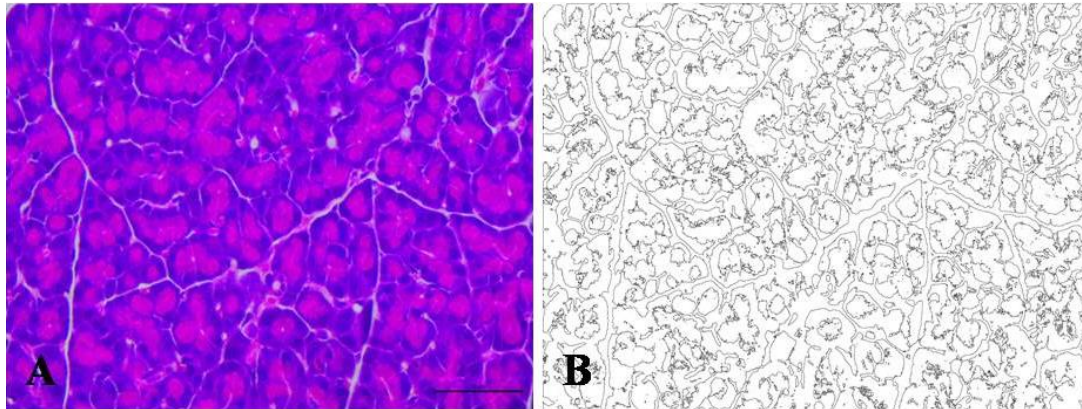
3.8. Semi-kvantitativna analiza DNK sadržaja – Feulgen bojenje

Prethodno deparafinisani i rehidratirani parafinski preseći tkiva izlagani su zagrejanom (60 °C) hlorovodoničnoj kiselini 8 minuta, ispirani u destilovanoj vodi 2x po 2 minuta, zatim inkubirani u Schiff reagensu 40 minuta na sobnoj temperaturi. Po završenoj inkubaciji preseći su prebačeni bez ispiranja u bisulfidnu vodu, 3 promene od po 10-15 sekundi. Nakon ispiranja u česmenskoj vodi 2 minuta, preseći su kontrastirani u Light Green, zatim dehidratirani, prosvetljeni u ksilolu i montirani u DPX.

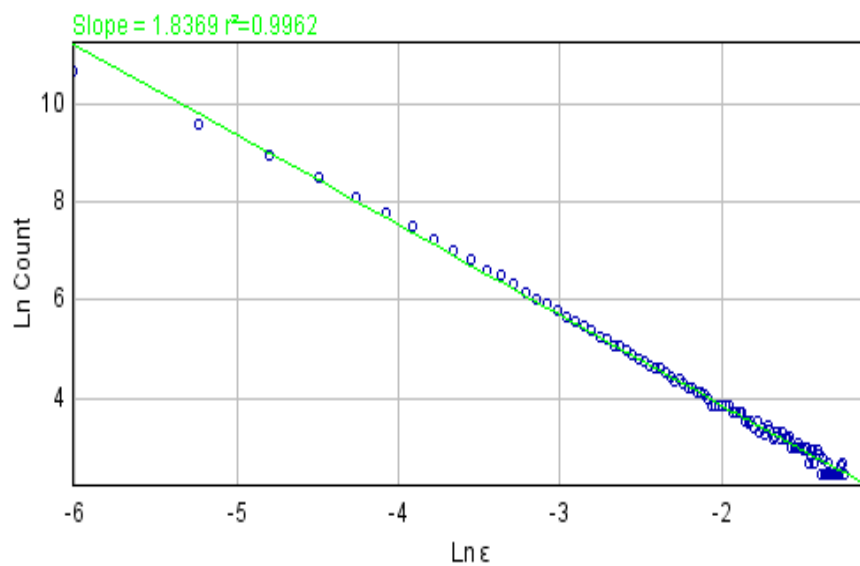
3.9. Fraktalna analiza

Tokom ispitivanja korišćena je fraktalna analiza kao najbolje afirmisana metoda za kvantitativnu analizu strukture i morfologije u biologiji i biološkim sistemima i sastoji se od fraktalne dimenzije i lakunarnosti.

Koristili smo jedan od najčešće primenjivanih metoda - metod prebrojavanja boksova (box-counting method). Fraktalna dimenzija se upotrebljava kao mera složenosti konture i njome se određuje tkivna kompleksnost. Međutim, merenjem lakunarnosti određuje se tkivna nehomogenost i ona karakteriše distribuciju praznina u fraktalu: fraktal sa visokom lakunarnošću poseduje velike praznine. Lakunarnost se može shvatiti kao mera dubinske neravnomernosti teksture posmatranog objekta. Što je veća dubina, veća je lakunarnost (**Slike 11 i 12**).



Slika 11. Primer digitalne mikrografije preseka tkiva egzokrinog pankreasa rutinski bojenog H&E (A). Mikrografija je binarizovana i autlajnovana (B) u ImageJ softveru pre izračunavanja parametara fraktalne dimenzije i lakunarnosti.



Slika 12. Primer logaritamske regresione linije na osnovu koje se računa fraktalna dimenzija $r=0,9979$.

3.10. Imunohistohemijska analiza

Primenjen je imunohistohemijski LSAB metod (*eng.* Labeled StreptAvidin Biotin). Ovaj visokosenzitivni metod podrazumeva upotrebu biotinizovanog sekundarnog antitela koje povezuje kompleks antigen/primarno antitelo sa streptavidin-peroksidaza konjugatom, koji postaje vidljiv nanošenjem odgovarajućeg hromogenog supstrata.

U svrhu imunohistohemijske analize na nivou svetlosnog mikroskopa (SM), korišćeni su parafinski preseći debljine 5 μm , kao i aralditski preseći debljine 1-2 μm . Parafinski preseći tkiva su prošli kroz rutinski proces deparafinizacije i rehidratacije.

Aralditski preseći su prošli kroz proceduru uklanjanja smole (u 1% rastvoru natrijumetoksida – 1% natrijum hidroksida (NaOH) u 100% etanolu, 30 minuta na 40 °C), a zatim i rehidratacije.

Nakon toga sprovedeno je demaskiranje u cilju otkrivanja epitopa (antigenih mesta). Svi preseći su inkubirani 5 minuta u 10 mM citratnom puferu, na 600W u mikrotalasnoj pećnici, i isprani dva puta u PBS (*engl.* phosphate-buffered saline). Preseći su dalje procesuirani u skladu sa preporukom proizvođača.

Nakon otkrivanja epitopa i ispiranja u PBS, izvršeno je blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonikperoksida (H_2O_2) u metanolu, u trajanju od 10 minuta. Po ispiranju, preseći su inkubirani sa primarnim antitelom odgovarajućeg razblaženja preko noći na 4 °C (**Tabela 2**). Nakon detaljnog ispiranja u PBS izvršena je inkubacija sa univerzalnom smesom sekundarnih antitela (zapreminsko razblaženje 1:1; anti-zečiji, anti-mišiji i anti-koziji imunoglobulini – LSAB univerzalni kit, Dako Scientific, Danska), 25 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su preseći inkubirani sa konjugatom streptavidina i peroksidaze rena, takođe 25 minuta na sobnoj temperaturi.

Detekcija mesta vezivanja u tkivu izvršena je inkubacijom preseka u 0.05% diaminobenzidinu (DAB, Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka) rastvorenom u PBS u prisustvu H₂O₂ (40 µL na 100 ml rastvora), do pojave bojene reakcije (maksimalno 10 minuta). Reakcija je prekinuta detaljnim ispiranjem u česmenskoj vodi. Preparati su kontrastirani Majerovim hematoksilinom. Nakon dehidracije i prosvetljivanja u ksilolu, pločice su montirane u DPX medijumu i analizirane svetlosnim mikroskopom Leica DMLB. Pozitivnost na antitelo se pod svetlosnim mikroskopom jasno uočava kao braon obojeni proizvod reakcije.

Tabela 2. Antitela korišćena u radu.

Primarna antitela	Kataloški broj	Proizvođač	Korišćeno razblaženje
α -amilaza	sc-46657	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:100
Ki-67	M7248	DAKO Scientific, Denmark	1:50
PCNA	sc-7907	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:200
pHH3	ab5176	Abcam, UK	1:200
Sekundarna antitela	Kataloški broj	Proizvođač	Korišćeno razblaženje
kozje anti-mišje, 10 nm zlato	ab27241	Abcam, UK	1:20

PCNA – nukleusni antigen proliferišućih ćelija (eng. Proliferating Cell Nuclear Antigen); pHH3 – fosforilisana forma histona H3 (eng. PhosphoHistone H3)

3.11. Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju

Odgovarajući tkivni uzorci, veličine oko 1mm³, fiksirani su u 2.5% rastvoru glutaraldehida u Sørensen fosfatnom puferu (0.1M, pH7.2) 4 sata na 4 °C. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, uzorci su postfiksirani u 2% rastvoru osmijum-tetroksida (OsO₄), koji je rastvoren u istom puferu, dva sata, na sobnoj temperaturi i zaštićeni od svetlosti.

Uzorci su zatim dehidratirani kroz seriju etanola rastuće koncentracije, prosvetljeni u propilen oksidu i ukalupljeni u Araldit smolu (Sigma Aldrich, Nemačka), na temperaturi od 50 °C tokom 72 sata.

3.12. Bojenje polutankih preseka

Ultramikrotomom Leica EM UC6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) opremljenim staklenim nožem sečeni su preseci debljine 2 µm (polutanki, semifine preseci) i preneti na mikroskopske pločice. Polutanki preseci bojani su rutinski 1% rastvorom toluidin plavog u 1% natrijum tetraboratu.

Bojenje je vršeno nakapavanjem jednake zapremine toluidin plavog i natrijum tetraborata na preseke, uz zagrevanje na grejnoj ploči dva minuta, nakon čega su preseci ispirani u česmenskoj vodi. Ovi preseci služili su za analizu opšte histološke organizacije pankreasa, kao i za orijentisanje uzorka za sečenje za ultrastrukturnu analizu.

Polutanki preseci posmatrani su na Leica DMLB svetlosnom mikroskopu opremljenom digitalnom kamerom Leica DFC295.

3.13. Morfometrijsko-stereološke analize

U cilju određivanja volumenske gustine citoplazme, granula i nukleusa acinusnih ćelija pankreasa, korišćeni su polutanki preseci tkiva. Volumenska gustina ćelijskih elemenata određena je Weibel metodom (*Weibel i sar., 1969*), na po deset nasumično odabranih testnih polja od svake životinje iz svih grupa. Analiza je vršena na svetlosnom Leica DMLB mikroskopu, korišćenjem Weibel višenamenskog testnog

okulara sa 42 tačke. Odnosom zbira svih tačaka koje padaju na strukture od interesa s ukupnim brojem tačaka koje padaju na tkivo egzokrinog pankreasa, korišćenjem sledeće formule se izračunava volumenska gustina strukture od interesa:

$$V_v = P_f/P_t$$

gde je V_v – volumenska gustina, P_f – broj tačaka koje padaju na strukturu od interesa, a P_t je 42, odnosno, ukupan broj tačaka Weibel mrežice.

Volumenska gustina citoplazme acinusnih ćelija pankreasa određena je kao odnos broja tačaka Weibel višenamenskog testnog sistema koje padaju na citoplazmu u odnosu na broj tačaka koje padaju na egzokrini pankreas, odnosno, acinusne ćelije.

Volumenska gustina granula acinusnih ćelija pankreasa određena je na sličan način, s tim da se računao odnos broja tačaka koje padaju na granule i broja tačaka koje padaju na acinusne ćelije.

Volumenska gustina nukleusa acinusnih ćelija pankreasa određena je, takođe na sličan način, s tim da se računao odnos broja tačaka koje padaju na nukleuse i broja tačaka koje padaju na acinusne ćelije.

3.14. Ultrastrukturalna analiza

Za transmisionu elektron-mikroskopsku (TEM) analizu, aralditski kalupi tkiva su istrimovani i isečeni dijamantskim nožem (Diatome, Švajcarska) na tanke preseke debljine 70 nm, na UC6 ultramikrotomu. Preseci su sakupljeni na bakar-ne paladijumske mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom u EM Stain aparatu (Leica Microsystems, Nemačka), a potom posmatrani na CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips-FEI, Holandija).

3.15. Dijametar zimogenih granula

Dijametar zimogenih granula određivan je na elektronskim mikrografijama uveličanja x10.000, merenjem u ImageJ softveru kao srednja vrednost kraćeg i dužeg dijametra za sto granula po grupi.

3.16. Imunocitohemijska analiza

Tanki preseci sakupljeni na niklovane mrežice presvučene olovkom, korišćeni su za imunogold pokazivanje i lokalizaciju α -amilaze u acinusnim ćelijama. Nakon otkrivanja epitopa po istovetnoj proceduri kao za polutanke preseke, preseci su inkubirani sa primarnim antitelom za α -amilazu u razblaženju 1:100.

Nakon ispiranja, mrežice su zatim inkubirane sa sekundarnim antitelom dekorisanim partikulama zlata dijametra 10 nm, pola sata. Ponovnim ispiranjem višak nevezanog antitela je ispran, mrežice su osušene na vazduhu, posmatrane i snimane na transmissionom elektronskom mikroskopu. Pozitivnost na antitelo uočava se kao prisustvo crnih tačaka dijametra 10 nm na posmatranoj strukturi.

3.17. Statistička obrada rezultata

Za određivanje jesu li skupovi podataka dobro organizovani normalnom raspodelom, primenjuju se testovi za ispitivanje normalnosti raspodele. Primenjivali smo D'Agostino-Pearsonov test normalnosti raspodele – koji izračunava koliko se svaka od tih vrednosti razlikuje od vrednosti koja je očekivana u slučaju normalne raspodele, te računa P vrednost iz zbira tih odstupanja. Primena testova za ispitivanje normalnosti

raspodele čini se jednostavnim načinom odlučivanja trebamo li se odlučiti za parametrijski ili neparametrijski test.

Ukoliko podaci slede Gaussovu (normalnu) raspodelu, razlike među grupama su analizirane jednosmernom (*engl.* one-way) ANOVA, a potom Tukey post-hoc testom, kako bi se utvrdile značajnosti između pojedinih grupa.

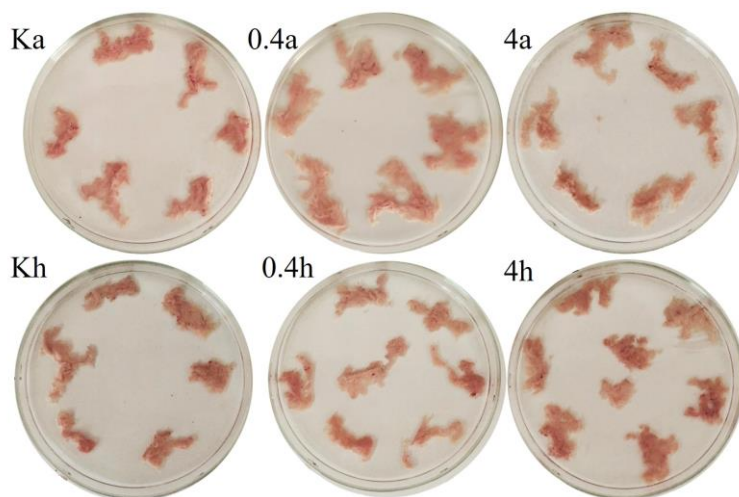
Ako podaci ne slede Gaussovu (normalnu) raspodelu, primenjuje se neparametrijski Kruskal Wallis test, a potom Dunns post-hoc test, kako bi se utvrdile značajnosti između pojedinih grupa. Podaci su statistički analizirani pomoću softverskog paketa GraphPad Prism 6 Demo, a statistička značajnost je prihvaćena za $p < 0.05$. Brojčane vrednosti rezultata merenja predstavljene su kao srednje vrednosti \pm standardna greška.

4. REZULTATI

Uticaj tretmana insulinom na remodeliranje egzokrinog pankreasa ispitivan je na mužjacima pacova soja Wistar. Životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe prema dozi apliciranog insulina (niska 0.4 IU i visoka 4 IU) i trajanju tretmana (1 dan, 1 injekcija – akutno i 3 dana, 3 injekcije – hronično) i poređene sa dve odgovarajuće kontrole (akutna i hronična).

4.1. Anatomija izolovanih pankreasa

Pri izolaciji pankreas pacova je mekan i difuzan i teže se odvaja od okolnih organa. Obavijen je tankom kapsulom od rastresitog vezivnog tkiva, od koje se pružaju septe koje dele parenhim pankreas na jasno uočljive lobuluse. U septama se uočavaju izvodni kanali i krvni sudovi. Nakon izolovanja pankreasi su očišćeni, slikani i izmereni. Morfološki, na izolovanim pankreasima (**Slika 13**) primećena promena u boji, prokrvljenosti i reznjevitosti bila je u granicama individualnih razlika.



Slika 13. Anatomija izolovanih pankreasa.

Naši rezultati ukazuju da dužina tretmana kao i uneta doza različito utiču na volumen i težinu pankreasa pacova u hiperinsulinemiji. Niska doza insulina u akutnom tretmanu je najefektnija u povećanju volumena i težine pankreasa (**Tabela 3**).

Tabela 3. Apsolutni volumen i masa pankreasa nakon akutnog tretmana insulinom.

DUŽINA TRETMANA	AKUTNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Ka	0.4 IU	4 IU	p
Volumen očišćenog pankreasa (ml)	1.167±0.062	1.750±0.103	1.250±0.138	n.s.
Masa očišćenog pankreasa (gr)	0.9367±0.075	1.338±0.0705	1.036±0.140	n.s.

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti grupe ± SEM (u koloni p predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).

Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

Uopšteno posmatrano, primećen je porast volumena i težine pankreasa kod akutno (**Tabela 3**) i hronično (**Tabela 4**) tretiranih grupa, u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4. Apsolutni volumen i masa pankreasa nakon hroničnog tretmana insulinom.

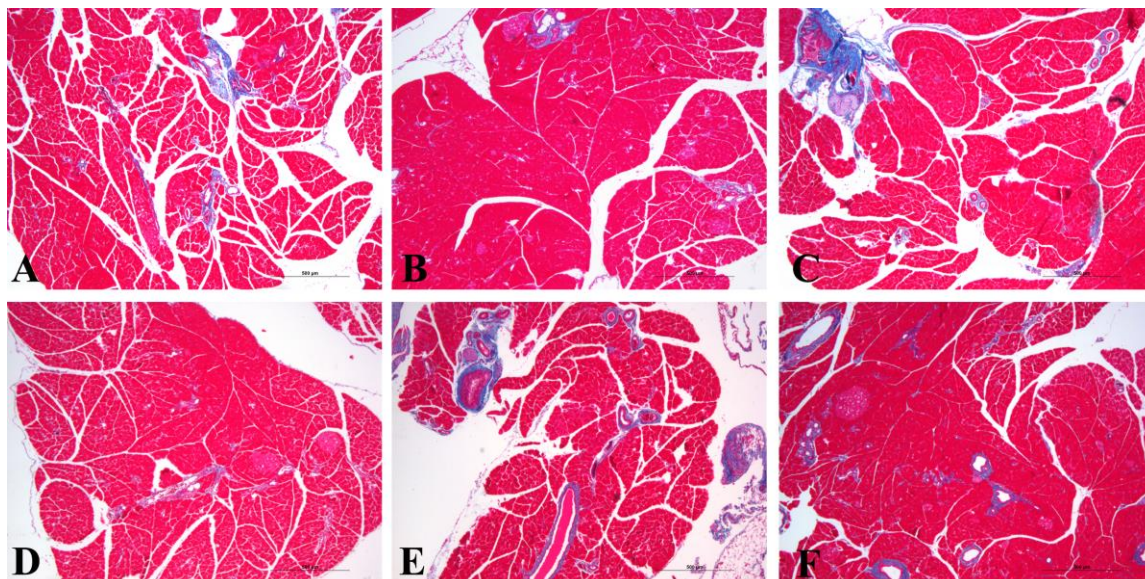
DUŽINA TRETMANA	HRONIČNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Kh	0.4 IU	4 IU	p
Volumen očišćenog pankreasa (ml)	1.114±0.174	1.257±0.057	1.407±0.044	n.s.
Masa očišćenog pankreasa (gr)	0.9443±0.160	0.757±0.053	1.137±0.063	n.s.

Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti grupe ± SEM (u koloni p predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).

Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

4.2. Histološka analiza

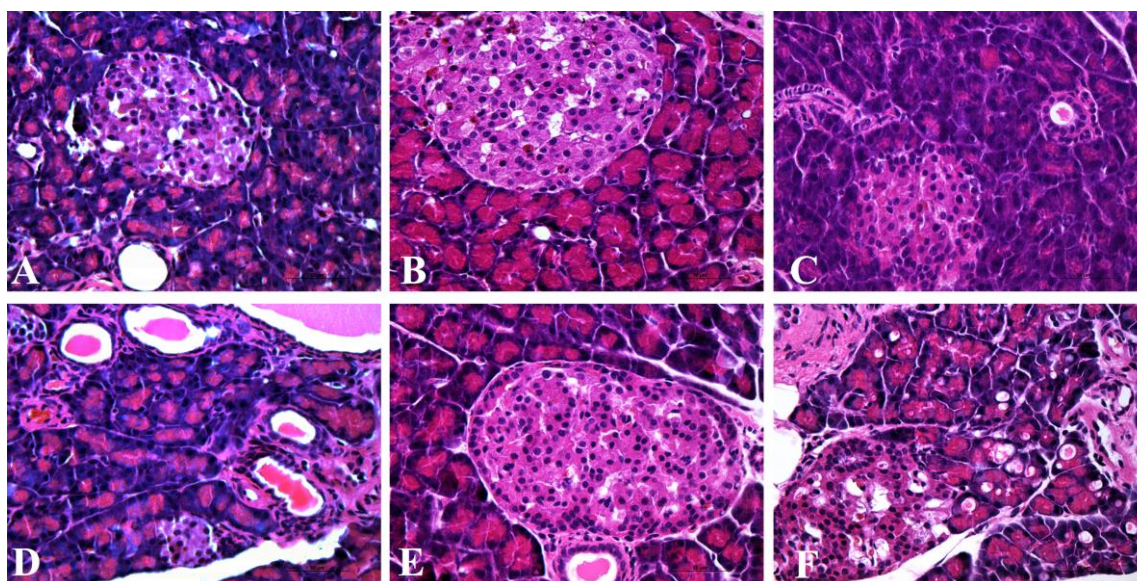
Na rutinski, AZANOM (Slika 14) ili hematoksilinom i eozinom (Slika 15) obojenim presecima pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije uočava se neznatno izmenjena histologija egzokrinog pankreasa pacova kod insulinom tretiranih životinja u odnosu na kontrolne grupe životinja. Kod kontrolnih grupa životinja uočava se karakteristična histološka građa, pankreas je najvećim delom izgrađen od acinusa egzokrinog pankreasa, izvodnih kanala i krvnih sudova. Manji deo pankreasa izgrađuju endokrine ćelije grupisane u svetlije obojena Langerhansova ostrvca. Egzokrini deo pankreasa predstavlja anastamozirajuću tubularnu mrežu koja na svojim krajevima formira acinuse. Acinus grade piramidalne krupne acinusne i manje centroacinusne ćelije. Detaljnom analizom većeg broja hematoksilin i eozin obojenih preseka, te AZAN obojenih tkivnih preseka pankreasa dobijeni su dodatni podaci o detaljima histološke građe.



Slika 14. Histološki izgled pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije kod akutne (A) i hronične (D) kontrole i insulinom tretiranih životinja; 0.4 IU akutna (B); 4 IU akutna (C); 0.4 IU hronična (E); 4 IU hronična (F). AZAN bojenje, uvećanje: x5.

Kod insulinom tretiranih životinja, u odnosu na kontrolne grupe životinja, primećene su diskretne promene u histološkoj građi egzokrinog pankreasa pacova. Te promene se ogledaju u više vezivnog i masnog tkiva koje se po pravilu nalazilo u blizini izvodnih kanalića i krvnih sudova (**Slika 14**).

Pored toga acinusi su često bili dislocirani, što je davalo rastresiti izgled čitavom organu. Takođe, promene u profilu vaskularne mreže bile su očiglednije u ovim grupama. Zavisno od uslova eksperimenta uočava se da eozinofilnija citoplazma na hematoksilinom i eozinom obojenim presecima potiče od brojnih zimogenih granula koje se nakupljaju u apikalnom delu acinusnih ćelija, dok je u bazalnom delu ćelije lokalizovan, po pravilu, jedan nukleus, mada se često mogu uočiti i brojne binukleusne acinusne ćelije. U zavisnosti od eksperimentalnih uslova, zimogene granule mogu zauzimati veći ili manji deo apikalne citoplazme acinusnih ćelija (**Slika 15**).

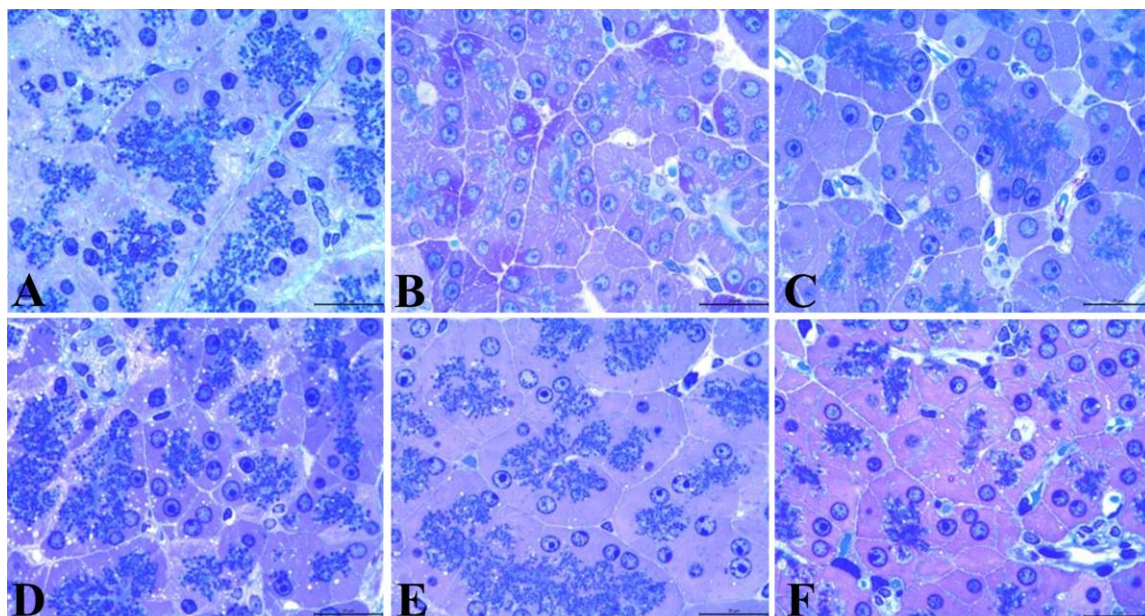


Slika 15. Histološki izgled acinusa i Langerhansovih ostrvaca pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije kod akutne (A) i hronične (D) kontrole i insulinom tretiranih životinja; 0.4 IU akutna (B); 4 IU akutna (C); 0.4 IU hronična (E); 4 IU hronična (F). Hematoksilin/eozin bojenje, uvećanje: x40.

Na presecima egzokrinog pankreasa bojenim hematoksinom i eozinom (**Slika 15**) uočava se prisustvo eozinofilnog materijala u izvodnim kanalima nezavisno od

primenjene doze i tretmana. Radi se o sekretornom produktu acinusa i duktalnih ćelija, njegova količina kao i tip izvodnih kanala u kojima je prisutan promjenjena je nakon tretmana. Radi detaljnijeg studiranja ekspresije α -amilaze u kontekstu sekrecije i njenog prisustva u izvodnim kanalima primenjene su imunohisto- i imunocitohemijski metodi (Slika 21).

Polutanki preseci obojeni metilenskim plavim i baznim fuksinom daju jasniju sliku ćelijske i unutarćelijske organizacije acinusa (Slika 16).



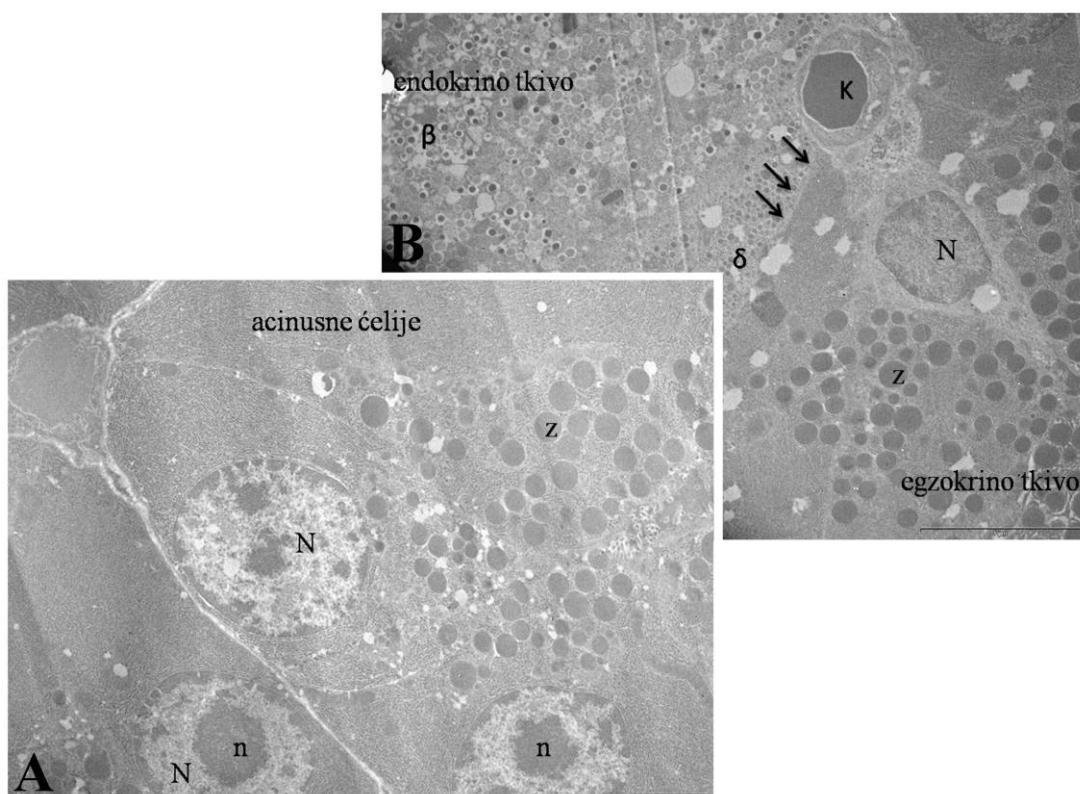
Slika 16. Morfologija acinusa egzokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije kod akutne (A) i hronične (D) kontrole i insulinom tretiranih životinja; 0.4 IU akutna (B); 4 IU akutna (C); 0.4 IU hronična (E); 4 IU hronična (F). Polutanki preseci obojeni metilenskim plavim i baznim fuksinom. Uvećanje: x40.

Kod akutno tretiranih grupa životinja sa porastom doze insulina primećeno je da su nukleusi krupniji, zimogene granule manje i slivene ka lumenu acinusa, a dolazi i do povećanja prostora između acinusa. Kod hronično insulinom tretiranih grupa sa porastom doze uočavaju se sitniji nukleusi i krupnije zimogene granule u apikalnom delu ćelije. Na polutankim presecima mogu se lakše uočiti centroacinusne ćelije i

mastociti. Identifikacija i kvantifikacija efekata eksperimentalnih uslova na morfološke promene tkiva egzokrinog pankreasa vršena je fraktalnom analizom, odabranim stereološkim metodama i imunohistohemijskom analizom.

4.3. Ultrastrukturna analiza

Ultrastrukturna analiza (Slika 17) je pružila uvid u detaljnu organizaciju acinusnih ćelija u egzokrinom tkivu pankreasa, izgled, veličinu i gustinu zimogenih granula, kao i organela uključenih u njihovu sintezu, skladištenje i sekreciju (egzocitozu).



Slika 17. Elektronske mikrografije tkiva pankreasa pacova, grupe hronično tretirane niskom dozom insulina. Granica između egzokrinog i endokrinog tkiva pankreasa (A, →). Acinusne ćelije egzokrinog tkiva pankreasa (B). β i δ ćelije Langerhansovog ostrvca, N – nukleus, n – nukleolus, z– zimogene granule, K – kapilar. Uvećanje: x5.000.

Pored acinusnih ćelija, koje su i najviše studirane, posmatrane su i centroacinusne i ćelije endokrinog pankreasa zbog njihove strukturno-funkcijske povezanosti (**Slika 17B**).

Acinusne ćelije su piramidalnog oblika sa širom bazom u kojoj su smešteni krupan, okrugao nukleus i bogato zastupljen granulirani endoplazmin retikulum. U centralnom delu acinusnih ćelija iznad nukleusa su raspoređeni Goldži kompleksi i lizozomi, sa strane mitohondrije, dok su u apikalnom delu smeštene tamne zimogene granule.

Bazalni deo acinusne ćelije okrenut je ka intersticijskom prostoru u kome se nalaze krvni sudovi, nervi i vezivno tkivo. Centroacinusne ćelije su manje sa centralno postavljenim nukleusom, svetlom citoplazmom sa malo granulisanog endoplazminog retikuluma i bez sekretornih granula.

4.4. Fraktalna analiza

Kvantitativna analiza strukture i morfologije egzokrinog tkiva pankreasa izvršena je fraktalnom analizom, koja se sastoji od fraktalne dimenzije i lakunarnosti. Fraktalna dimenzija je samo jedan od alata u fraktalnoj analizi, koja daje indeks kapaciteta posmatranog fraktalnog objekta da popuni prostor u kome se nalazi, dok merenjem lakunarnosti određuje se tkivna nehomogenost i ona karakteriše distribuciju praznina u fraktalu.

U **Tabelama 5 i 6**, prikazane su srednje vrednosti i standardne greške praćenih elemenata fraktalne analize u četiri insulinom tretirane grupe životinja. Srednja vrednost fraktalne dimenzije egzokrinog pankreasa značajno je uvećana u obe akutno insulinom tretirane grupe životinja 0.4 IU i 4 IU u poređenju sa kontrolnom grupom životinja, dok

se između tretiranih grupa to ne uočava (**Tabela 5**). Na razlike u vrednosti fraktalne dimenzije kod akutno tretiranih grupa životinja prevashodno je uticao porast doze apliciranog insulina, sa porastom doze insulina raste i fraktalna dimenzija. Srednja vrednost lakunarnosti kod akutno insulinom tretiranih grupa životinja je značajno smanjena u 4 IU grupi u odnosu na kontrolnu grupu i 0.4 IU grupu što je prikazano u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Efekat akutno apliciranog insulina na vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti.

DUŽINA TRETMANA	AKUTNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Ka	0.4 IU	4 IU	p
Fraktalna dimenzija	1.792±0.002	1.807±0.003***	1.814±0.002***	n.s.
Lakunarnost	0.131±0.002	0.126±0.001	0.117±0.001***	***

*Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti grupe ± SEM, *** $p < 0.001$ (u koloni p predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).*

Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

Dosadašnje analize su nam pokazale da dolazi do povećanja vrednosti fraktalne dimenzije tkiva egzokrinog pankreasa kao odgovor na povećanje doze apliciranog insulina nezavisno od dužine trajanja tretmana. Sve gore navedeno se odražava na povećanu strukturnu kompleksnost (merenu fraktalnom dimenzijom) i manju strukturnu heterogenost (mereno lakunarnošću) tkiva egzokrinog pankreasa.

Srednja vrednost fraktalne dimenzije kod hronično insulinom tretiranih grupa životinja je značajno smanjena u 0.4 IU grupi u poređenju sa odgovarajućom kontrolom i 4 IU grupom (**Tabela 6**).

Kod hronično insulinom tretiranih grupa životinja dolazi do značajnog porasta srednje vrednosti lakunarnosti u 0.4 IU grupi u poređenju sa odgovarajućom kontrolom i značajnog smanjenja u poređenju sa 4 IU grupom (**Tabela 6**).

Tabela 6. Efekat hronično apliciranog insulina na vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti.

DUŽINA TRETMANA	HRONIČNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Kh	0.4 IU	4 IU	p
Fraktalna dimenzija	1.810±0.002	1.804±0.002	1.812±0.002	***
Lakunarnost	0.123±0.001	0.128±0.001***	0.120±0.001	***

*Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti grupe ± SEM, ***p<0.001 (u koloni p predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).*

Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

Strukturalna kompleksnost kod hronično insulinom tretiranih životinja značajno je manja u 0.4 IU grupi u poređenju sa kontrolom, dok 4 IU hronično insulinom tretirane grupe pokazuju veće vrednosti u poređenju sa 0.4 IU grupom. Nasuprot tome, strukturalna heterogenost hronično insulinom tretiranih životinja značajno je veća u 0.4 IU grupi u odnosu na kontrolu i 4 IU grupu. Na razlike u vrednosti fraktalne dimenzije uticala je i dužina trajanja tretmana. Iz **Tabele 6** može se videti da je kao posledica prilagođavanja na stres kod hroničnih grupa životinja došlo do približavanja vrednosti fraktalne dimenzije u 0.4 IU i 4 IU grupi sa kontrolnom grupom životinja.

Dosadašnje analize su nam pokazale da dolazi do smanjenja homogenosti (lakunarnosti) tkiva egzokrinog pankreasa kao odgovor na povećanje doze apliciranog insulina, nezavisno od dužine trajanja tretmana (**Tabela 6**).

4.5. Morfometrijsko-stereološke analize

Polutanki preseći tkiva pankreasa korišćeni su za morfometrijsko-stereološku analizu remodeliranja acinusa. Volumenske gustine (Vv) odgovarajućih elemenata acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa su određivane Weibel višenamenskim testnim sistemom. Dijametar zimogenih granula određivan je na elektronskim mikrofografijama u ImageJ softveru. Dobijeni rezultati volumenskih gustina citoplazme, granula i nukleusa, kao i dijametra zimogenih granula acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa prikazani su u **Tabelama 7 i 8.**

Kod akutno insulinom tretiranih životinja u 0.4 IU grupi u poređenju sa odgovarajućom kontrolom dolazi do statistički značajnog porasta vrednosti volumenske gustine citoplazme acinusnih ćelija, dok statistička značajnost u poređenju sa 4 IU grupom odsustvuje (**Tabela 7**).

Tabela 7. Efekat akutno apliciranog insulina na volumensku gustinu kompartmenata acinusnih ćelija i dijametar zimogenih granula.

DUŽINA TRETMANA	AKUTNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Ka	0.4 IU	4 IU	p
Volumenska gustina citoplazme	0.458±0.015	0.553±0.021***	0.494±0.017	n.s.
Volumenska gustina nukleusa	0.09±0.008	0.083±0.008	0.077±0.006	n.s.
Volumenska gustina granula	0.23±0.009	0.113±0.001***	0.245±0.013	***
Dijametar zimogenih granula	0.744±0.015	0.716±0.018	0.586±0.012***	***

*Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti grupe ± SEM, ***p<0.001 (u koloni p predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).*

Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

Iako se iz **Tabele 8** vidi da postoji tendencija ka povećanju volumenske gustine citoplazme acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa, jednofaktorska analiza varijanse nije pokazala postojanje statistički značajne razlike među grupama hronično insulinom tretiranih životinja. Ovi rezultati nam ukazuju da niske doze insulina kod akutno tretiranih životinja značajno povećavaju vrednosti volumenske gustine citoplazme acinusnih ćelija, što se može tumačiti i kao povećanje sekretorne aktivnosti acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa i promenu unutarćelijske organizacije.

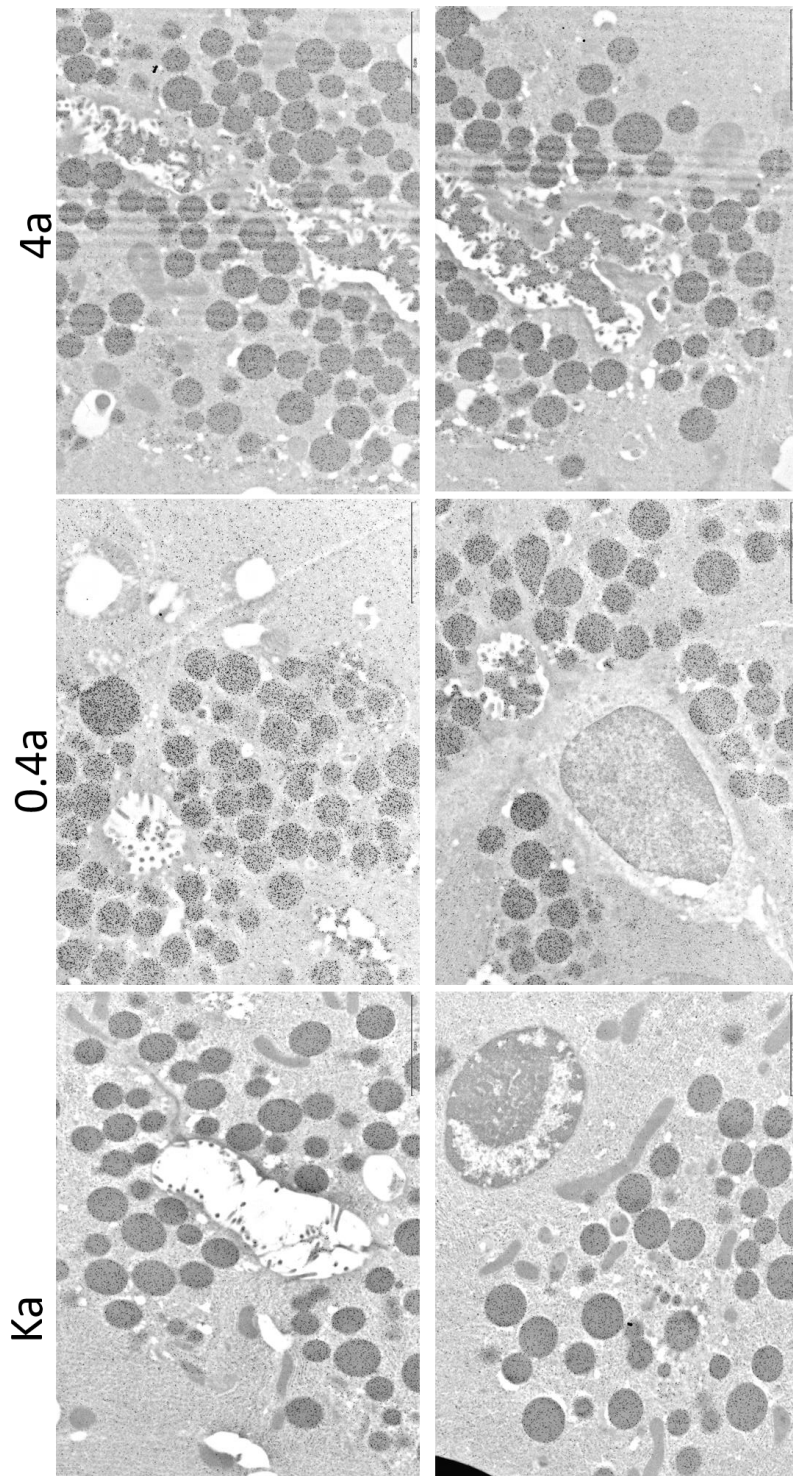
Tabela 8. Efekat hronično apliciranog insulina na volumensku gustinu kompartmenata acinusnih ćelija i dijametar zimogenih granula

DUŽINA TRETMANA	HRONIČNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Kh	0.4 IU	4 IU	p
Volumenska gustina citoplazme	0.416±0.015	0.437±0.018	0.459±0.017	n.s.
Volumenska gustina nukleusa	0.089±0.007	0.085±0.007	0.103±0.007	n.s.
Volumenska gustina granula	0.326±0.013	0.298±0.016	0.266±0.009**	n.s.
Dijametar zimogenih granula	0.669±0.016	0.646±0.013	0.712±0.014	**

*Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti grupe ± SEM, **p<0.01 (u koloni p predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).*

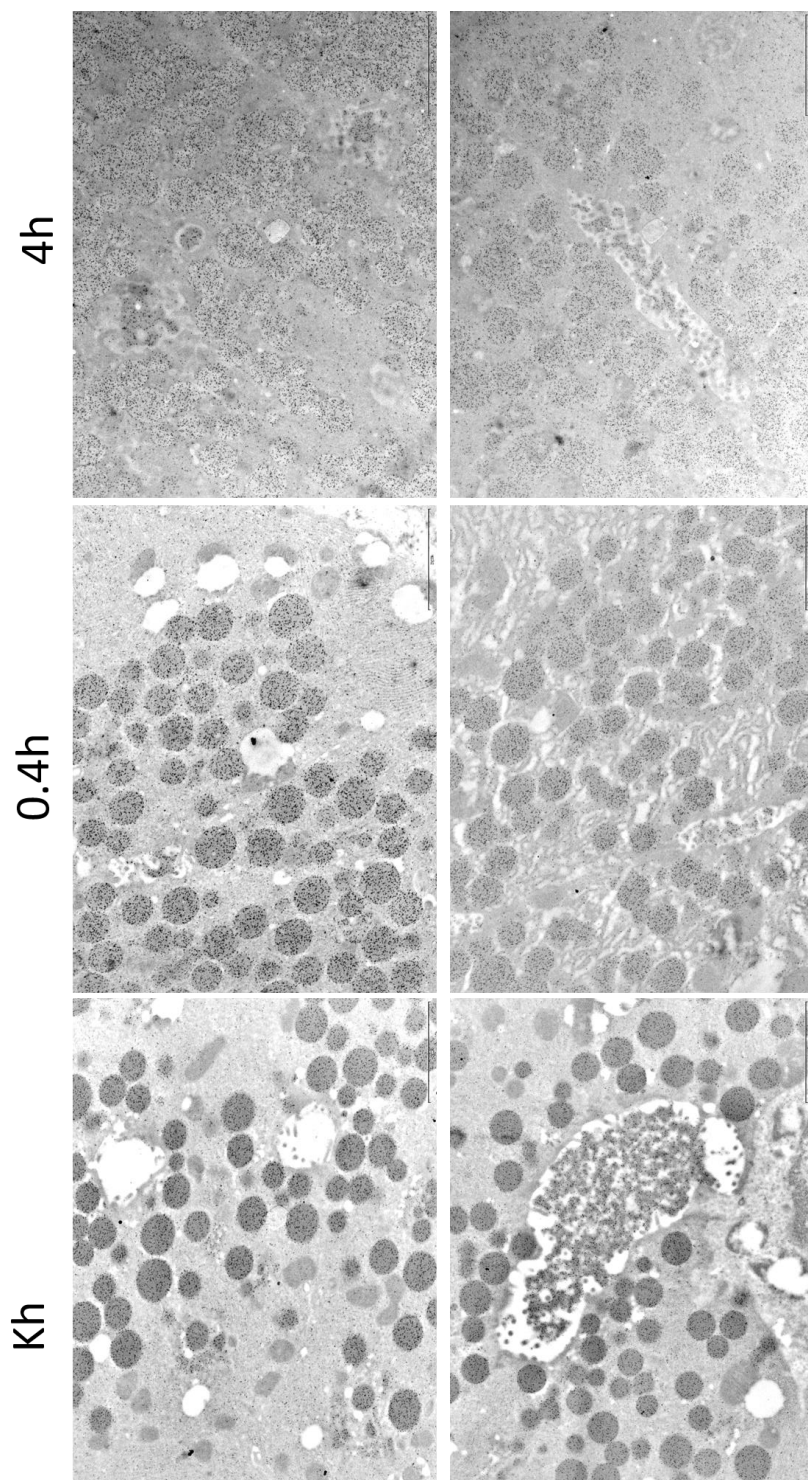
Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

Volumenske gustine granula acinusnih ćelija kod akutno tretiranih grupa životinja su statistički značajno smanjenje u 0.4 IU grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Međutim, vrednost volumenske gustine granula acinusnih ćelija u 4 IU grupi je značajno veća od vrednosti u 0.4 IU grupi. Na osnovu rezultata iz **Tabele 7** možemo uočiti značajan pad vrednosti volumenske gustine granula kod 0.4 IU grupe u poređenju sa druge dve grupe, što je najverovatnije posledica egzocitoze granula usled stresa i nedovoljne doze insulina koja bi stimulisala proizvodnju zimogenih granula u acinusnim ćelijama egzokrinog pankreasa (**Slika 18**).



Slika 18. Morfometrijsko-stereološka analiza žimogenih granula u akutno tretiranom grupama životinja, obeleženih na amilazu imunogold metodom. Uvećanje: x10.000, transmisiona elektronska mikroskopija.

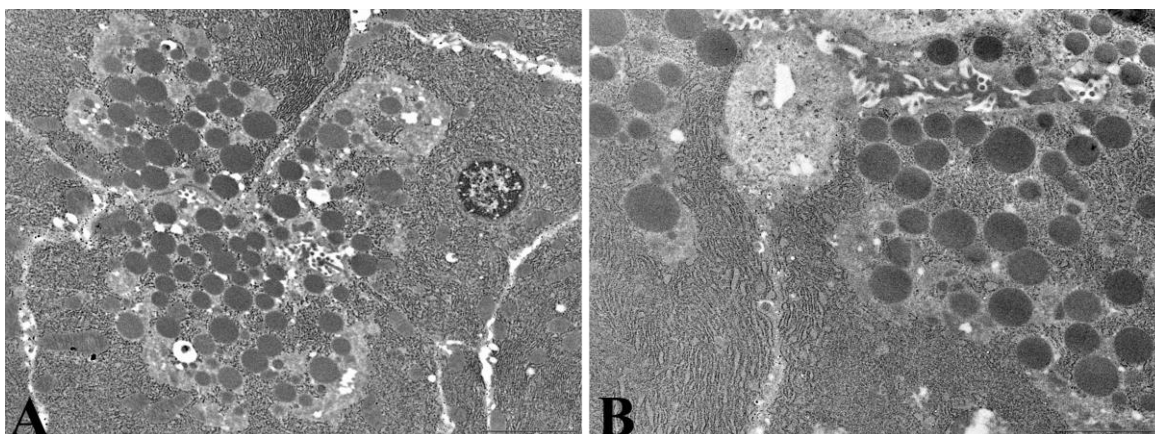
Srednja vrednost volumenske gustine granula acinusnih ćelija kod hronično insulinom tretiranih životinja je značajno manja kod 4 IU grupe u poređenju sa odgovarajućom kontrolom, ali bez statistički značajne razlike u poređenju sa 0.4 IU grupom. Takve morfometrijske promene praćene su povećanom proizvodnjom i egzocitozom zimogenih granula acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa. Promene u volumenskoj gustini granula acinusnih ćelija kod hronično insulinom tretiranih životinja (**Slika 19**) su prikazane u **Tabeli 8**.



Slika 19. Morfometrijsko-stereološka analiza zimogenih granula u hronično tretiranim grupama životinja, obeleženih na amilazu imunogold metodom. Uvećanje: x10.000, transmisiona elektronska mikroskopija.

Sa povećanjem doze insulina dolazi do statistički značajnog smanjenja vrednosti dijametra zimogenih granula u 4 IU grupi akutno insulinom tretiranih životinja (**Tabela 7 i Slika 20A**).

Nasuprot tome, sa povećanjem dužine trajanja tretmana i doze insulina dolazi do porasta vrednosti dijametra zimogenih granula u 4 IU grupi insulinom tretiranih životinja u odnosu na 0.4 IU grupu (**Tabela 8 i Slika 20B**).



Slika 20. Morfometrijsko-stereološka analiza dijametra zimogenih granula u akutno (A) i hronično (B) tretiranim grupama životinja visokom dozom insulina (4 IU). Uvećanje: x10.000, transmisiona elektronska mikroskopija.

Iako se iz **Tabele 7** vidi da sa porastom doze apliciranog insulina postoji tendencija ka smanjenju volumenske gustine nukleusa u akutnim grupama, odnosno njenog porasta u hroničnoj grupi sa većom dozom insulin (**Tabela 8**), jednofaktorska analiza varijanse nije pokazala postojanje statistički značajne razlike među grupama.

Varijacije u broju nukleusa acinusnih ćelija su zavisne od doze i dužine trajanja tretmana. Srednja vrednost broja binukleusnih i mononukleusnih ćelija dobijena je pregledom deset slučajno odabranih vidnih polja (**Tabele 9 i 10**).

Analizom srednje vrednosti broja binukleusnih acinusnih ćelija kod akutno tretiranih grupa životinja uočava se statistički značajno povećanje vrednosti u 0.4 IU grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (**Tabela 9**).

Tabela 9. Efekat akutno apliciranog insulina na broj binukleusnih i mononukleusnih acinusnih ćelija.

DUŽINA TRETMANA	AKUTNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Ka	0.4 IU	4 IU	p
Binukleusne acinusne ćelije	2.5±0.373	5±0.633**	3.4±0.542	n.s.
Mononukleusne acinusne ćelije	36.2±1.389	42.7±1.613*	31.4±1.833	***

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti grupe ± SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (u koloni **p** predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).
Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

Kod hronično tretiranih grupa, primećen je blagi porast broja binukleusnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti (**Tabela 10**).

Tabela 10. Efekat hronično apliciranog insulina na broj binukleusnih i mononukleusnih acinusnih ćelija.

DUŽINA TRETMANA	HRONIČNO			
EKSPERIMENTALNE GRUPE	Kh	0.4 IU	4 IU	p
Binukleusne acinusne ćelije	1.6±0.4	2.4±0.521	2.9±0.379	n.s.
Mononukleusne acinusne ćelije	38.4±1.778	35.1±1.479	36.5±1.881	n.s.

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti grupe ± SEM, (u koloni **p** predstavljena je statistička značajnost poređenja između grupa tretiranih insulinom).
Ka-akutna kontrola, Kh-hronična kontrola.

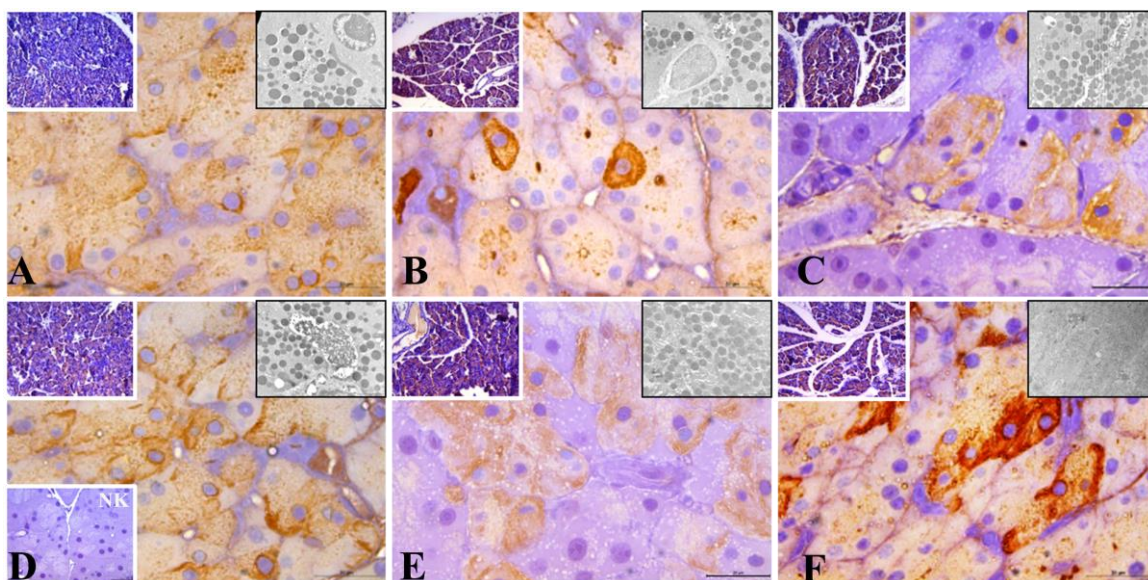
Sa druge strane, broj mononukleusnih ćelija u akutno insulinom tretiranim grupama značajno je povećan u 0.4 IU grupi, u poređenju sa kontrolnom grupom i 4 IU grupom (**Tabela 9**). Kod hronično tretiranih grupa, primetan je blagi pad u broju mononukleusnih ćelija kod obe grupe, 0.4 IU i 4 IU, u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti (**Tabela 10**).

4.6. Histochemijske i imunohistochemijske analize

Histochemijskim Feulgen bojenjem pokazana je i kvantifikovana količina DNK u nukleusima acinusnih ćelija. Kvantitativnom imunohistochemijskom analizom je pokazano prisustvo i distribucija α -amilaze, pHH3, Ki67 i PCNA u egzokrinom pankreasu insulinom tretiranih pacova i odgovarajućih kontrola.

4.7. Imunoekspresija α -amilaze

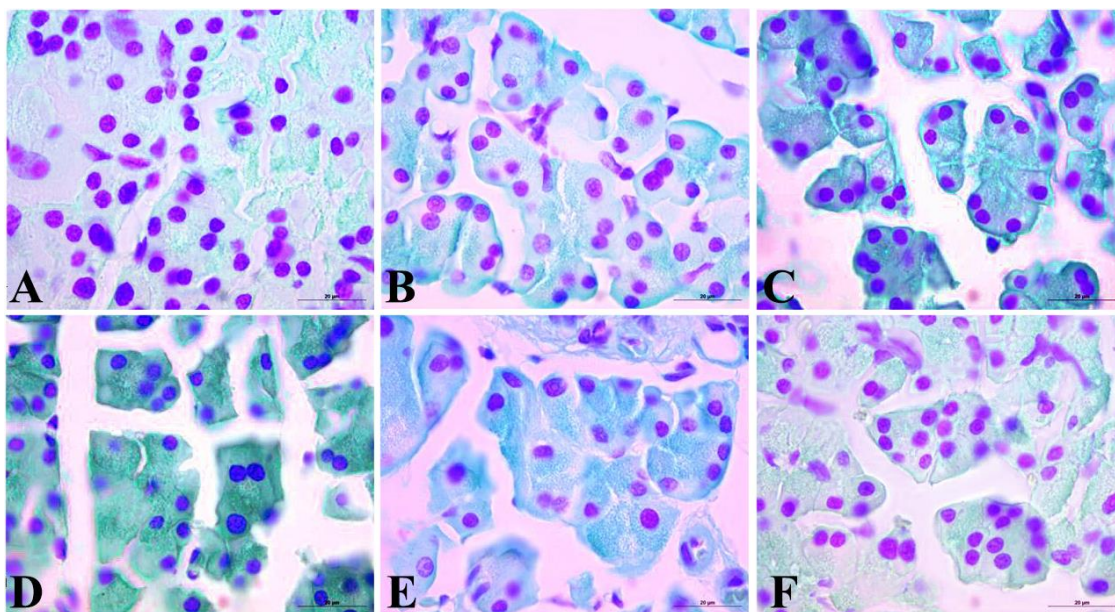
Uočeno je da viša doza insulina u akutno tretiranoj grupi smanjuje imunoekspresiju α -amilaze u acinusnim ćelijama, a povećava u odvodnim kanalićima, dok je obrnuta situacija u hroničnim grupama (Slika 21).



Slika 21. Imunoekspresija α -amilaze na polutankim presecima pankreasa i na parafinskim presecima -inseti levo; gornji desni inset-imunogold obeležavanje. Akutna (A) i hronična (D) kontrola i insulinom tretirane grupe: 0.4 IU akutno (B); 4 IU akutno (C); 0.4 IU hronično (E); 4 IU hronično (F). NK-negativna kontrola.

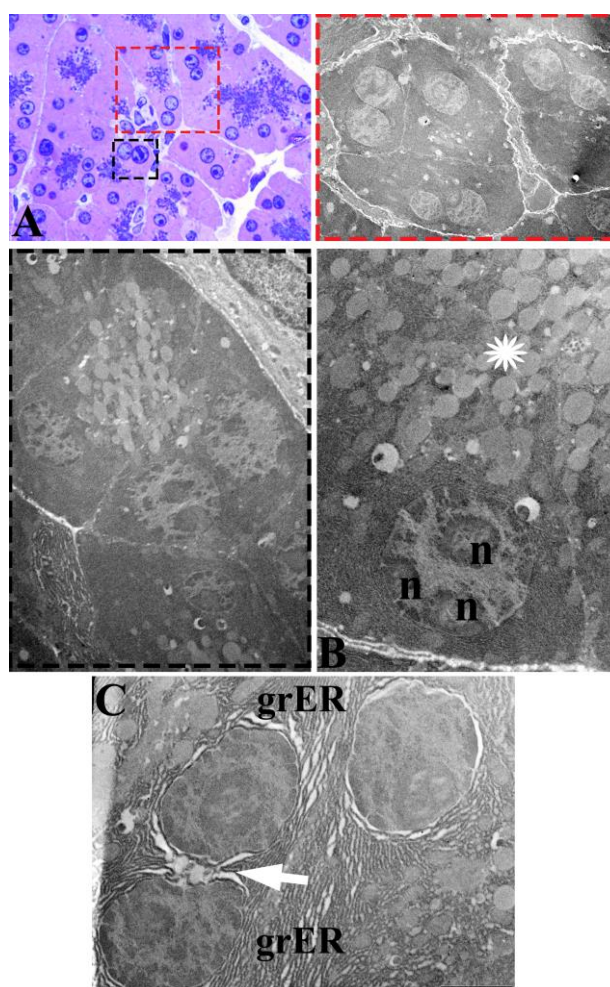
4.8. Feulgen bojenje, imunoekspresija markera proliferacije i sintetska aktivnost binukleusnih acinusnih ćelija

S obzirom da je tretman insulinom izazvao pojavu binukleusnih acinusnih ćelija, imunohistohemijski je analizirano prisustvo i lokalizacija markera proliferacije, a Feulgen bojenjem (Slika 22) pokazana je i kvantifikovana količina DNK u nukleusima acinusnih ćelija. Odabrana su tri markera, pHH3, Ki-67 i PCNA čija je ekspresija i subćelijska lokalizacija karakteristična za različite faze ćelijskog ciklusa. U svim grupama zapažena je vrlo slaba, bleđa i sporadična imunopozitivnost za sva tri navedena mitotska markera. Binukleusne ćelije nisu pokazivale imunopozitivnost. Feulgen bojenje pokazalo je da binukleusi nisu posledica sintetske, S-faze ćelijskog ciklusa i da su sa *n* sadržajem DNK. Mononukleusi takođe nisu pokazali pozitivnost karakterističnu za poliploidni sadržaj DNK.



Slika 22. Feulgen bojenje na DNK sadržaj u mono- i binukleusima acinusnih ćelija. Akutna (A) i hronična (D) kontrola i insulinom tretirane grupe: 0.4 IU akutno (B); 4 IU akutno (C); 0.4 IU hronično (E); 4 IU hronično (F). Uvećanje: x40.

Povećana sintetska aktivnost binukleusnih acinusnih ćelija detaljno je analizirana sa elektronskih mikrografija (**Slika 23**). Uočena je bliskost nukleusa (**Slika 23A**), povećan broj izuzetno aktivnih nukleolusa kao i nukleusnih pora (**Slika 23B**) i kontinuitet nukleusnog ovoja (**Slika 23C**). Nukleusi su krupni i većinom euhromatski. Dobro razvijen grER prisutan je u neposrednoj blizini nukleusa, a veći broj zimogenih granula u apikalnom delu acinusne ćelije.



Slika 23. Binukleusne acinusne ćelije (crveni i crni pravougaonik) posmatrane svetlosnim (A) i elektronskim mikroskopom. (B) Nukleus sa tri nukleolusa (n). Binukleusi spojeni perinukleusnim ovojem (strelica). Zimogene granule (zvezdica); grER – granulisani endoplazmin retikulum. Uvećanje: A – x40; A – ineti x3.000; B – x5.000; C – x8.000.

5. DISKUSIJA

Mnoge studije su pokušale da sagledaju osnove i mehanizme delovanja koji povezuju endokrine ćelije Langerhansovih ostrvaca i egzokrine acinusne ćelije pankreasa. Shodno tome, proučavan je efekat insulinskog tretmana na morfologiju tkiva pankreasa. Insulin, zavisno od primenjene doze (0.4 IU ili 4 IU/kg telesne mase) i dužine trajanja tretmana (1 dan – akutno ili 3 dana – hronično) ostvaruje različite efekte na arhitekturu tkiva egzokrinog pankreasa. Zapaženo je da različite doze insulina značajno menjaju volumensku gustinu granula acinusnih ćelija. Zbog toga je analiziran efekat insulina (stimulatorni i inhibitorni) na sintezu i sekreciju α -amilaze i efekat na volumensku gustinu i dijametar zimogenih granula. Promene u volumenskoj gustini i dijametru zimogenih granula praćene su promenama u strukturi acinusnih ćelija, kao i u tkivu egzokrinog pankreasa. Takođe, proučavan je i efekat insulinskog tretmana na proliferaciju ćelija, praćenjem imunoekspresije markera ćelijskog ciklusa (pHH3, Ki67 i PCNA), kao i ekspresiju α -amilaze.

Poznato je da insulin direktno (preko insulinskih receptora) i indirektno (putem holecistokinina) reguliše sintezu enzima i sekreciju egzokrinog pankreasa (*Williams i Goldfine, 1985; Cano i sar., 2007; Barreto i sar., 2010; Pandol, 2010*). Mnogobrojne morfološke i hemodinamske studije pokazale su da je insulin neophodan za normalnu, fiziološku funkciju acinusnih ćelija. Insulin je glavni regulator ekspresije u acinusima i rasta egzokrinog pankreasa; mnoge studije o nedostatku insulina (dijabetes melitus) pokazale su da dolazi do fibroze egzokrinog pankreasa i smanjenog odgovora na hormonsku stimulaciju (*Piciucchi i sar., 2015*). Posmatrani zajedno, rezultati disertacije jasno ukazuju na to da egzogeni i endogeni insulin stimuliše sekreciju acinusnih ćelija, što dovodi do povećanja volumenske gustine granula i citoplazme, kao

i promena na morfološkom nivou, a što je u skladu sa literaturnim podacima (*Bani i sar., 1989; Taga i sar., 1999; Pap, 2004; Williams, 2010*).

Kvantifikacija promena na morfološkom nivou, naročito diskretnih, zahteva nove metodološke pristupe kakva je fraktalna analiza. Fraktalna analiza se oslanja na morfološku složenost i unutrašnju samo-sličnost (matricu) koju poseduje većina izvornih oblika koji se javljaju u prirodi. Heterogenost acinusnih ćelija igra važnu ulogu u bilo kojoj promeni morfologije koja se može otkriti fraktalnom analizom. Sve ove promene mogu povećati nivo detalja tokom fraktalne analize. Morfološke promene tkiva egzokrinog pankreasa mogu se okarakterisati fraktalnom dimenzijom koja meri obrasce promena sa amplifikacijom, te stoga može objasniti kompleksnost slike. Vrednosti fraktalne dimenzije se kreću od 1 do 2, a veće vrednosti predstavljaju veću složenost. Lakunarnost meri homogenost slike od 0 do 1, niže vrednosti ukazuju na homogenost, dok više vrednosti ukazuju na heterogenost (*Jo i sar., 2013; Pantić i sar., 2013*).

Akutni tretman insulina, nezavisno od primenjenih doza, značajno je povećao fraktalnu dimenziju acinusa pankreasa i smanjio lakunarnost. Hronični tretman insulina sa niskim dozama značajno smanjuje fraktalnu dimenziju i povećava lakunarnost acinusa pankreasa, dok je visoka doza imala suprotan efekat. Zbog toga parametri fraktalne analize pružaju pouzdane informacije o efektima insulina na morfološke promene u egzokrinom pankreasu (*Pajević i sar., 2017*). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim radovima o povećanju sinteze enzima u acinusnim ćelijama nakon terapije insulinom (*Pap, 2004; Barreto i sar., 2010; Al-Mrabeh i sar., 2016*), ali po prvi put pokazuju promene egzokrinog pankreasa u uslovima privremene i brze hiperinsulinemije, odnosno kratkotrajnog tretmana.

Složenost eksperimentalnog sistema omogućava tačan prikaz efekta insulina na egzokrinu sekreciju pankreasa. Prethodno objavljeni podaci ukazuju na to da insulin ima dugoročni efekat na regulaciju biosinteze digestivnih enzima pankreasa i kratkoročni efekat na stimulaciju sekrecije pankreasa (*Bani i sar., 1989; Blanco-Molina i sar., 1991*). Očekuje se da će efekat egzogenog insulina dovesti do povećanja stope sinteze enzima u endoplazminom retikulumu, što se odražava na povećanje volumenske gustine citoplazme, kao i volumenske gustine granula. Stereološke analize iz ove studije pokazale su da akutno niska i hronično visoka doza insulina značajno smanjuje volumensku gustinu granula i povećava volumensku gustinu citoplazme, dok je volumenska gustina nukleusa pokazala blage promene koje nisu bile statistički značajne.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji bacaju novo svetlo na suprotstavljene efekte endogeno sintetisanog i egzogeno unetog insulina. Naime, put insulina koji se prenosi iz ostrvaca do acinusnih ćelija u egzokrinom delu pankreasa, preko portnog sistema, je strukturno i funkciono dobro organizovan (*Cano i sar., 2007; Barreto i sar., 2010; Piciucchi i sar., 2015*), ali ne isključuje neposredan put ka bližim ostrvcima (periinsularnim). To potvrđuju i podaci da su egzokrini acinusi u blizini ostrvaca koja sadrže insulin uvećani, sa više zimogenih granula u poređenju sa acinusima pored insulin-negativnih ostrvaca (*Williams i Goldfine, 1985; Aughsteen i Mohammed, 2002*).

Takođe je pokazano da uticaj insulina iz nivoa Langerhansovog ostrvca na acinuse nije istovetan u svim delovima pankreasa, ni u svim acinusima (*Williams i Goldfine, 1985*). Pitanje da li prvo reaguju periinsularni a zatim sve udaljeniji acinusi, i dalje ostaje otvoreno. To je zapravo pitanje postojanja strukturno-funkcione jedinice egzokrinog pankreasa i razjašnjenja mehanizama njenog uspostavljanja i funkcionisanja.

U ranim radovima se pretpostavljalo da je ta jedinica kapilar-acinus-mali izvodni kanal, dok se danas razmatraju pozicije acinusa u kontekstu endokrinih ostrvaca (*Merkwitz i sar., 2013*). Zapravo, razlike u mikroarhitekturi acinusa potiču još iz embrionskog razvoja, iz vremena formiranja izvodnih kanala i položaja ćelije u njemu koja je rodonačelna za Langerhansovo ostrvce. Kod pacova se endokrino ostrvce formira u proksimalnom delu acinusa, za razliku od čoveka gde je periferno i to će usloviti specifičnu morfologiju pankreasa, ali i specifičnost insulo-acinusnog portalnog sistema, inervacije i okruženosti brojem i vrstom acinusa (*Merkwitz i sar., 2013*).

Kao direktna posledica specifičnosti mikroarhitekture pankreasa opisana su tri tipa mikrocirkulacije unutar endokrinog ostrvca miša (*Nyman i sar., 2008*), a koja će diktirati za koje će se acinuse izlučeni insulin prvo vezati i kako će dalje ići talas aktivacije acinusnih ćelija i sekrecija zimogenih granula.

In vivo i *in vitro* studije jasno ističu da insulo-acinusna osa ima glavnu ulogu u funkcionisanju pankreasa. Na izolovanim acinusima pacova i miševa pokazano je da oni poseduju insulinske receptore i da nakon vezivanja za njih insulin reguliše niz funkcija: transport glukoze, sintezu proteina, brojnost holecistokininskih receptora (*Saito i sar., 1980; Hayden i sar., 2008; Campbell-Thompson i sar., 2015*).

Rezultati disertacije su pokazali da u akutnom tretmanu višom dozom insulina dolazi do smanjenja dijametra zimogenih granula, što dobro korelira sa redukcijom imuno-ekspresije α -amilaze u acinusnim ćelijama i istovremenim povećanjem u izvodnim kanalićima. Hronični tretman višom dozom insulina ostvaruje suprotan efekat.

Egzogeni unos insulina ima stimulatívni efekat na sintezu α -amilaze i zavisi od doze unetog insulina. Morfometrijske studije na pacovima kod kojih je dijabetes izazvan streptozotocinom pokazale su smanjenje broja zimogenih granula, što odgovara

redukciji sadržaja amilaze u homogenatu tkiva pankreasa (*Williams i Goldfine, 1985; Gregoire i Bendayan, 1986; Aughsteen i Mohammed, 2002; Madole i sar., 2016; Nakajima, 2016*).

Zapažene promene u mikroarhitekturi pankreasa nije jednostavno kvantifikovati, naročito kada egzogeno primenjen insulin izaziva finu promenu sinteze i sekrecije zimogenih granula i time remodeliranje na nivou pojedinačnih ćelija ili samo vršnih delova acinusa. Zato je u ovoj studiji fraktalna analiza odabrana kao dodatni metod, pored morfometrije i stereologije i iskorišćena za uočavanje i kvantifikovanje remodeliranja celog pankreasa pod delovanjem insulina.

Naime, u novim studijama je pokazano da se fraktalna dimenzija može koristiti kao prognostički faktor za mnoge karcinome i uspešno primeniti prilikom analize odgovora na hemioterapiju (*Gheonea i sar., 2014*). Primena fraktalne i stereološke analize omogućila je rasvetljavanje morfološke promene egzokrinog pankreasa u našem eksperimentalnom modelu i ukazala na remodeliranje acinusnih domena, tkivnih i ćelijskih.

Od svih merenih parametara, volumenska gustina granula je u skladu sa fraktalnom dimenzijom, ali fraktalna dimenzija nije u skladu sa lakunarnošću, što navodi na zaključak da egzogeno primenjen insulin menja sintezu enzima u ćelijama acinusa i povećava udeo zimogenih granula u volumenu acinusnih ćelija. Povećana ili smanjena volumenska gustina zimogenih granula i citoplazme praćena je promenama strukture acinusnih ćelija, a samim tim i tkiva egzokrinog pankreasa. Ovi rezultati su u skladu sa ranije objavljenim podacima gde je utvrđeno da *in vivo* insulin ima stimulatívni efekat na sintezu amilaze (*Ashcroft i Rorsman, 2012*). Istovremeno, egzogeno primenjen insulin ima suprotan efekat na sekreciju pankreasnog soka i

bikarbonata (*Hamamoto i sar., 2002*). Moguće je da je insulin indirektno izmenio oblik i veličinu lumena acinusa u koje su izlučeni pankreasni enzimi. Sve ove promene mogu povećati nivo detalja tokom binarizacije i pregleda digitalnih slika, a samim tim i vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti (*Hotar i Salac, 2014*). Na takav zaključak navode i podaci da svaka promena u obliku acinusa može imati značajan uticaj na složenost tkiva egzokrinog pankreasa.

Promene u sintetskoj i sekretornoj aktivnosti acinusnih ćelija nakon tretmana insulinom uočene su na nivou ekspresije α -amilaze imunohistohemijskim i imunocitohemijskim bojenjem. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa zapaženim promenama u veličini granula i volumenskoj gustini granula u acinusnim ćelijama, odnosno proširenim lumenima izvodnih kanala, jer je u njima uočena izrazita pozitivnost na sekretovanu α -amilazu.

Sugerisano je da ćelije koje sintetišu značajne količine proteina, kao što su acinusne ćelije, često postaju poliploidne i da je pojava binukleusnih ćelija neophodna međufaza u ovoj progresiji. Nedavne studije su pokazale da binukleusne acinusne ćelije nastaju deljenjem mononukleusnih ćelija, a ne ćelijskom fuzijom. Adaptivne promene unutar ćelija takođe mogu uključiti binukleusnost, kao odgovor pankreasa na insulinske stimulse (*Ge i Morgan, 1990; Wollny i sar., 2016*). Prema nekim prethodnim rezultatima, insulin reguliše sintezu α -amilaze pankreasa uglavnom na nivou transkripcije (*Söling i Unger, 1972*). Kao posledica egzogeno apliciranog insulina u pankreasu pacova dolazi do pojave binukleusnih ćelija, kao rezultat povećanja enzimske sinteze (*Wollny i sar., 2016*). Rezultati disertacije sugerišu da je povećanje broja binukleusnih i mononukleusnih ćelija stimulatívni efekat niskih doza insulina na sintezu α -amilaze.

Pored efekta na sintezu α -amilaze, tretman insulinom izazvao je promene i u sekretornoj aktivnosti acinusnih ćelija. Proučavanjem imunoekspresije α -amilaze zapaža se da u akutnoj grupi tretiranoj višom dozom insulina dolazi do značajnog smanjenja ekspresije u ćelijama acinusa a povećanja u izvodnim kanalima. Hronični tretman insulinom pokazuje suprotan efekat. S obzirom da se sinteza i sekrecija α -amilaze u egzokrinom pankreasu dinamično modifikuju (*Williams i Goldfine, 1985; Aughsteen i Mohammed, 2002; Pap, 2004*), zapažene promene odgovaraju neposrednom uticaju insulina na acinusne ćelije. Izgleda da insulin ostvaruje kratkoročni efekat na stimulaciju sekrecije a dugoročni efekat na stimulaciju sinteze α -amilaze.

Rezultati dobijeni u disertaciji u saglasnosti su sa literaturnim podacima i ukazuju na to da binukleusne acinusne ćelije predstavljaju postmitotičko stanje i terminalnu diferencijaciju acinusnih ćelija, a da mononukleusne ćelije funkcionišu kao rezerva ćelijske populacije (*Oates i Morgan, 1986; Longnecker, 1987; Ge i Morgan, 1990; Wollny i sar., 2016*).

Da bi proverili ovaj zaključak praćena su tri mitotska markera koji obeležavaju ćelije u različitim fazama ćelijskog ciklusa za određivanje proliferativne aktivnosti (*Fung i sar., 2013; Wollny i sar., 2016*), kao i Feulgen reakcija za kvantifikaciju DNK u nukleusu. Istovremeno, posmatrana je imunopozitivnost binukleusnih ćelija u odnosu na mononukleusne, ali je uočen nedostatak proliferativne aktivnosti ćelija acinusa, bleđa i sporadična imunopozitivnost za pHH3, Ki-67 i PCNA tokom insulinskog tretmana, nezavisno od primenjene doze i dužine. Feulgen reakcija takođe nije pokazala da su nukleusi acinusnih ćelija poliploidni. Moguće je da binukleusnost predstavlja adaptaciju pankreasa kao odgovor na povećanu sintezu proteina. Efekat insulina u trajanju od tri dana ne dovodi do proliferacije ćelija, a pojavljivanje binukleusnih ćelija je posledica

aktivacije ćelijske transkripcije. Naši rezultati sugerišu da binukleusne acinusne ćelije pankreasa u ovom eksperimentalnom modelu predstavljaju oblik terminalno diferenciranih ćelija nesposobnih za dalju deobu. Moguće je da binukleusnost omogućava acinusnim ćelijama da u daljem izazovu hiperinsulinemije omoguće početnu bisintetsku aktivnost, istovremenu sintezu zimogenih granula u vrhu i insulina u bazi acinusnih ćelija. Time se negativnom spregom autosuprimiraju sinteza i/ili sekrecija α -amilaze i iscrpljivanje acinusa. Rezultati drugih autora u saglasnosti su sa našim rezultatima (*Masini i sar., 2017*). Takođe, ove ćelije bi u uslovima visokih i produženih hiperinsulinemija verovatno mogle da se podele suprimirajući tako atrofogeni efekat na acinuse, a time i na digestivne enzime.

Dalja analiza funkcijske i morfološke heterogenosti acinusnih ćelija pankreasa neophodna je da otkrije razliku između binukleusnih i mononukleusnih ćelija, razlog njihovog pojavljivanja i dalju sudbinu.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Primenjeni insulinski tretman indukovao je dozno- i vremenski-zavisno strukturno remodeliranje tkiva egzokrinog pankreasa, ukazujući na veliki značaj insulina u održavanju njegovog normalnog funkcionisanja, ali i potencijalnu ulogu u etiologiji metaboličkih bolesti.

Strukturne promene zapažene na histološkom nivou su uporedo kvantifikovane primenom morfometrije i fraktalne analize.

Rezultati histološke analize pokazali su da:

- Akutni tretman insulinom, sa porastom doze, povećava prostor između acinusa; nukleusi acinusnih ćelija postaju krupniji, a zimogene granule sitnije i slivene ka lumenu acinusa. Hroničnim tretmanom insulinom, sa porastom doze, nukleusi acinusnih ćelija postaju sitniji, a zimogene granule krupnije i nagomilane u apikalnom delu ćelije.

Morfometrijska i fraktalna analiza pokazale su da:

- akutni tretman insulinom, nezavisno od primenjenih doza, značajno povećava fraktalnu dimenziju acinusa pankreasa i smanjuje lakunarnost;
- hronični tretman insulinom ostvaruje suprotan efekat u odnosu na dozu – niska doza značajno smanjuje fraktalnu dimenziju i povećava lakunarnost acinusa pankreasa, dok visoka doza značajno povećava fraktalnu dimenziju i smanjuje lakunarnost acinusa pankreasa.

Efekat insulina na ekspresiju α -amilaze

Ultrastrukturalna analiza organela-markera ekspresije sekretornih proteina acinusnih ćelija i imunoekspresija α -amilaze u acinusima pankreasa je pokazala da insulin ostvaruje kratkoročni efekat na stimulaciju sekrecije zimogenih granula i dugoročni efekat na stimulaciju sinteze α -amilaze, remodelirajući nukleus i granulisani endoplazmin retikulum:

- Akutna visoka doza insulina dovodi do proširenja granulisanog endoplazminog retikuluma, smanjenja dijametra zimogenih granula, redukcije imuno-ekspresije α -amilaze u acinusnim ćelijama i njenog povećanja u izvodnim kanalićima, dok je hronična imala suprotan efekat. Akutno niska i hronično visoka doza insulina značajno smanjuju volumensku gustinu granula i povećavaju volumensku gustinu citoplazme.
- Niska i sporadična imunoekspresija pHH3, Ki-67 i PCNA u acinusnim ćelijama, kao i povećanje broja binukleusnih ćelija pokazali su da insulin ostvaruje značajan efekat na aktivaciju ćelijske transkripcije i translacije bez hiperplazije ćelija, ali uz zadržavanje proliferativnog potencijala.

Prolazne hiperinsulinemije, karakteristične za gojaznost i rane faze razvoja dijabetesa i drugih metaboličkih bolesti, podražavane u ovim eksperimentima, dovode do značajnih promena u strukturi egzokrinog pankreasa i time stvaraju trajnu podlogu za izmenjenu funkciju.

Fraktalna analiza se pokazala kao metod koji može da izdvoji i pokaže najfinije histološke i citološke promene, i stoga se može iskoristiti kao dodatna ili alternativna

dijagnostička metoda rutinskoj histologiji za brzu i preciznu kvantifikaciju diskretnih promena u arhitekturi “zdravog” tkiva neposredno uz sam tumor.

7. LITERATURA

Al-Mrabeh, A., Hollingsworth, K. G., Steven, S., Taylor, R. (2016). Morphology of the pancreas in type 2 diabetes: effect of weight loss with or without normalisation of insulin secretory capacity. *Diabetologia*, 59, 1753-1759.

Aughsteeen, A. A. and Mohammed, F. I. (2002). Insulin enhances amylase and lipase activity in the pancreas of streptozotocin-diabetic rats. An in vivo study. *Saudi Med J*, 23, 838-844.

Ashcroft, F. M. and Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell*, 148, 1160-1171.

Bani, D., Magnani, L., Sacchi, T. B., Biliotti, G. (1989). The exocrine pancreas in patients with hyperinsulinemic hypoglycemia. A morphometrical and ultrastructural study. *Int J Pancreatol*, 5, 239-248.

Barreto, S. G., Carati C. J., Toouli, J., Saccone, G. T. P. (2010). The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G10-22.

Bertelli, E. and Bendayan, M. (1997). Intermediate endocrine-acinar pancreatic cells in duct ligation conditions. *Am J Physiol*, 273, C1641-1649.

Bizzarri, M., Giuliani, A., Cucina, A., D'Anselmi, F., Soto, A. M., Sonnenschein, C. (2011). Fractal analysis in a systems biology approach to cancer. *Semin Cancer Biol*, 21, 175-182.

Blanco-Molina, A., González-Reyes, J. A., Torre-Cisneros, J., López-Miranda, J., Nicolás, M., Pérez-Jiménez, F. (1991). Effects of hypothyroidism on the ultrastructure of rat pancreatic acinar cells: a stereological analysis. *Histol Histopathol*, 6, 37-42.

Budimlija, Z. (1998). *Fraktalna priroda neuronskih oblika*. Academia, Zadužbina Andrejević, Beograd.

Czakó, L., Hegyi, P., Rakonczay, Z., Wittmann, T., Otsuki, M. (2009). Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance. *Pancreatology*, 9, 351-359.

Campbell-Thompson, M., Rodriguez-Calvo, T., Battaglia, M. (2015). Abnormalities of the exocrine pancreas in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*, 15, 79.

Cano, D. A., Hebrok, M., Zenker, M. (2007). Pancreatic development and disease. *Gastroenterology*, 132, 745-762.

Cerf, M. E., Muller, C. J., Du Toit, D. F., Louw, J., Wolfe-Coote, S. A. (2006). Hyperglycaemia and reduced glucokinase expression in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet. *Br J Nutr*, 95, 391-396.

- Cerf, M. E., Chapman, C. S., Louw, J. (2012). High-fat programming of hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperleptinemia, and altered islet architecture in 3-month-old wistar rats. *ISRN Endocrinol*, 2012, 627270.
- Chen, N., Unnikrishnan, I. R., Anjana, R. M., Mohan, V., Pitchumoni, C. S. (2011). The complex exocrine-endocrine relationship and secondary diabetes in exocrine pancreatic disorders. *J Clin Gastroenterol*, 45, 850-861.
- Cordain, L., Eades, M. R., Eades, M. D. (2003). Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comp Biochem Physiol, A Mol Integr Physiol*, 136, 95-112.
- Corkey, B. E. (2012). Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence. *Diabetes*, 61, 4-13.
- Di Ieva, A., Bruner, E., Widhalm, G., Minchev, G., Tschabitscher, M., Grizzi, F. (2012). Computer-assisted and fractal-based morphometric assessment of microvasculature in histological specimens of gliomas. *Sci Rep*, 2, 429.
- Ferro, D. P., Falconi, M. A., Adam, R. L., Ortega, M. M., Lima, C. P., de Souza, C. A., Lorand-Metze, I., Metze, K. (2011). Fractal characteristics of May-Grünwald-Giemsa stained chromatin are independent prognostic factors for survival in multiple myeloma. *PLoS One*, 6, e20706.
- Fung, A. D., Cohen C., Kavuri, S., Lawson, D., Gao, X, Reid, M. D. (2013). Phosphohistone H3 and Ki-67 labeling indices in cytologic specimens from well-differentiated neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas: a comparative analysis using automated image cytometry. *Acta Cytol*, 57, 501-508.
- Ge, Y. C. and Morgan, R. G. H. (1990). Changes in numbers of pancreatic acinar cell nuclei and in DNA content during raw soya flour feeding in mice. *Am J Anat*, 189, 207-212.
- Gheonea, D. I., Streba, C. T., Vere, C. C., Șerbănescu, M., Pirici, D, Comănescu, M., Streba, L. A., Ciurea, M. E., Mogoanta, S., Rogoveanu, I. (2014). Diagnosis system for hepatocellular carcinoma based on fractal dimension of morphometric elements integrated in an artificial neural network. *Biomed Res Int*, 239706.
- Goldfine, I. D and Williams, J. A. (1983). Receptors for insulin and CCK in the acinar pancreas: relationship to hormone action. *Int Rev Cytol*, 85, 1.
- Gonzalez, E., Flier, E., Molle, D., Accili, D., McGraw, T. E. (2011). Hyperinsulinemia leads to uncoupled insulin regulation of the GLUT4 glucose transporter and the FoxO1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10162-10167.

- Grapin-Botton, A., Majithia, A. R., Melton, D. A. (2001). Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev*, 15, 444-454.
- Gregoire, S. and Bendayan, M. (1986). Immunocytochemical studies of pancreatic acinar cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 29, 655-660.
- Gunstream, S. E. (2018). *Anatomy and physiology study answers*. eBook. Ch 15. Digestive system. The McGraw-Hill Companies.
- Guyton, A. C. and Hall, J. (2003). *Medicinska fiziologija*. Deseto izdanje, Savremena administracija, Beograd.
- Hamamoto, N., Ashizawa, N., Niigaki, M., Kaji, T., Katsube, T., Endoh, H., Watanabe, M., Sumi, S., Kinoshita, Y. (2002). Morphological changes in the rat exocrine pancreas after pancreatic duct ligation. *Histol Histopathol*, 17, 1033-1041.
- Hardt, P. D., Ewald, N. (2011). Exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus: a complication of diabetic neuropathy or a different type of diabetes? *Exp Diabetes Res*, 761950.
- Hayden, M. R., Patel, K., Habibi, J., Gupta, D., Tekwani, S. S., Whaley-Connell, A., Sowers, J. R. (2008). Attenuation of endocrine-exocrine pancreatic communication in type 2 diabetes: pancreatic extracellular matrix ultrastructural abnormalities. *J Cardiometab Syndr*, 3, 234-243.
- Henderson, J. R., Daniel, P.M., Fraser, P. A. (1981). The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland. *Gut*, 22, 158-167.
- Hotar, V. and Salac, P. (2014). Surface evaluation by estimation of fractal dimension and statistical tools. *Sci World J*, 2014, 435935.
- Jo, J., Hörnblad, A., Kilimnik, G., Hara, M., Ahlgren, U., Periwäl, V. (2013). The fractal spatial distribution of pancreatic islets in three dimensions: a self-avoiding growth model. *Phys Biol*, 10, 036009.
- Johnson, J. D. and Alejandro, E. U. (2008). Control of pancreatic beta-cell fate by insulin signaling: The sweet spot hypothesis. *Cell Cycle*, 7, 1343-1347.
- Kaidanovich-Beilin, O., Cha, D. S., McIntyre, R. S. (2012). Insulin's role in body and brain. Insulin, long recognized as a primary regulator of blood glucose, is now also understood to play key roles in neuroplasticity, neuromodulation, and neurotrophism. *The Science*, 33591.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2005). The pancreas. In: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Saunders, 7th edition, 939-953.
- Letić, D., Živković, D.K. (2014). Fraktalne forme. Vedes, Beograd.
- Löhr, M., Klöppel, G. (1987). Residual insulin positivity and pancreatic atrophy in relation to duration of chronic type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and microangiopathy. *Diabetologia*, 30, 757-62.
- Longnecker, D. S. (1987). Interface between adaptive and neoplastic growth in the pancreas. *Gut*, 28(S1), 253-258.
- MacDonald, P. E. (2011). Signal integration at the level of ion channel and exocytotic function in pancreatic β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E1065-E1069.
- Madole, M. B., Iyer, C. M., Madivalar, M. T., Wadde, S. K., Howale, D. S. (2016). Evaluation of biochemical markers serum amylase and serum lipase for the assessment of pancreatic exocrine function in diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res*, 10, BC01-BC04.
- Mandelbrot, B. B. (1982). The fractal geometry of nature. San Francisco, Macmillan.
- Masini, M., Marselli, L., Himpe, E., Martino, L., Bugliani, M., Suleiman, M. (2017) Co-localization of acinar markers and insulin in pancreatic cells of subjects with type 2 diabetes. *PLoS One*, 12, e0179398.
- Merkwitz, C., Blaschuk, O. W., Schulz, A., Lochhead, P., Meister, J., Ehrlich, A., Ricken, A. M. (2013). The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. *Progr Histochem Cytochem*, 48, 103-140.
- Mehran, A. E., Templeman, N. M., Brigidi, G. S., Lim, G.E., Chu, K. Y., Hu, X., Botezelli, J. D., Asadi, A., Hoffman, B. G., Kieffer, T. J., Bamji, S. X., Clee, S. M., Johnson, J. D. (2012). Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab*, 16, 723-737.
- Metze, K. (2013). Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 13, 719-735.
- Motta, P. M., Macchiarelli, G., Nottola, S. A., Correr, S. (1997). Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Tech*, 37, 384-398.
- Nakajima, K. (2016). Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation. *World J Diabetes*, 7, 112-121.
- Nyman, L. R., Wells, K. S., Head, W. S., McCaughey, M., Ford E, Brissova, M., Piston, D. W., Powers, A. C. (2008). Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. *J Clin Invest*, 118, 3790-3797.

- Oates, P. S. and Morgan, R. G. H. (1986). Changes in pancreatic acinar cell nuclear number and DNA content during aging in the rat. *Am J Anat*, 177547-177554.
- Pajevic, M., Aleksic, M., Golic, I., Markelic, M., Otasevic, V., Jankovic, A., Stancic, A., 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.
- Pandol, S. J. (2010). *The Exocrine Pancreas*. San Rafael, Morgan & Claypool Life Sciences, ed 2011/06/03.
- Pantic, I., Nestic, D., Stevanovic, D., Starcevic, V., Pantic, S., Trajkovic, V. (2013). Effects of ghrelin on the structural complexity of exocrine pancreas tissue architecture. *Microsc Microanal*, 19, 553-558.
- Pap, A. (2004). Effects of insulin and glucose metabolism on pancreatic exocrine function. *Int J Diabetes Metab*, 12, 30-34.
- Permyakov, N. K., Padolskii, A. E., Titova, G. P. (1973). Ultrastructural analysis of the secretory cycle of the pancreas (Russian), Moscow.
- Piciucchi, M., Capurso, G., Archibugi, L., DelleFave, M. M., Capasso, M., DelleFave, G. (2015). Exocrine pancreatic insufficiency in diabetic patients: prevalence, mechanisms, and treatment. *Int J Endocrinol*, 595649.
- Russell, D. A, Hanson, J. D, Ott, E. (1980). Dimension of strange attractors. *Phys Rev Lett*, 45, 1175–1178.
- Rhodes, C. J., White, M. F. (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *Eur J Clin Invest*, 32, 3-13.
- Ross, H. M. and Wojciech, P. (2011). *Histology. Digestive System III: Liver, Gallbladder and Pancreas*. Sixth Edition, 647-655.
- Saito, A., Williams, J. A., Kanno, T. (1980). Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *J Clin Invest*, 65, 777-782.
- Samuel, V. T. and Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148, 852-871.
- Schloithe, A. C., Woods, C. M., Saccone, G. T. P. (2011). An isolated rat pancreas preparation for studying pancreatic spinal mechanosensitive and chemosensitive afferent activity. *Pancreapedia*, doi: 10.3998/panc.2011.13.

- Shanik, M. H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., Roth, J. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse. *Diabetes Care*, 31, 262-268.
- Sirri, R., Bianco, C., Vico, G. D., Carella, F., Bonaldo, A., Sarli, G., Tondini, G., Mandrioli, L. (2014). Proliferation, apoptosis, and fractal dimension analysis for the quantification of intestinal trophism in sole (*Solea solea*) fed mussel meal diets. *BMC Vet Res*, 10, 148.
- Slack, J. M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121, 1569-1580.
- Söling, H. and Unger, K. (1972). The role of insulin in the regulation of α -amylase synthesis in the rat pancreas. *Euro J Clinical Invest*, 2, 199-212.
- Taga, R., Faverão, M. R., Cestari, T. M., de Assis, G. F. (1999). Morphometric dimensions of Syrian golden hamster pancreas of both sexes. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 76, 41-46.
- Weibel, E. R., Kistler, G. S., Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*, 30, 23-38.
- West, B. J. (2010). Fractal physiology and the fractional calculus: a perspective. *Front Physiol*, 1, 12.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26, 19-39.
- Williams, J. A., Goldfine, I. D. (1985). The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes*, 34, 980-986.
- Williams, J. A. (2010). Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol*, 26, 478-483.
- Wollny, D., Zhao, S., Everlien, I., Lun, X., Brunken, J., Brüne, D., Ziebell, F., Tabansky, I., Weichert, W., Marciniak-Czochra, A, Martin-Villalba, A. (2016). Single-cell analysis uncovers clonal acinar cell heterogeneity in the adult pancreas. *Dev Cell*, 39, 289-301.

BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA DOKTORANTA

1. Biografija

Opšti podaci:

Ime, srednje slovo i prezime: Mila J. Pajević (devojačko Krsmanović)

Datum i mesto rođenja: 01.09.1975.god, Užice

Porodiljsko odsustvo: 2011. i 2015. god.

Obrazovanje:

2000 diplomirani biolog, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

2005 magistar bioloških nauka, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, magistarska teza “Korelacija ekspresije protein BRCA1 i drugih bioloških markera kod karcinoma dojke”

Zaposlenje:

2001-2002 istraživač, Naučno istraživački centar u Užicu

2002 profesor biologije, Medicinska škola u Užicu

2002 glavni biolog-tehnolog, Služba za patohistologiju Kliničkog centra Srbije

Kursevi:

2002 Imunohistohemija

2005 Kurs iz humane genetike i molekularne dijagnostike

2012 Cytoscreening

Strani jezici:

Engleski jezik

2. Bibliografija:

B1. Radovi u časopisima međunarodnog značaja (M23)

1. Nikolic A, Knezevic S, **Krsmanovic M**, Micev M, Ristanovic M, Radojkovic D. M23 (2009) Analysis of K-RAS gene codon 12 mutation in pancreatic tissue of patients with pancreatic cancer. ArchBiol Sci, 61:623-629.
2. **Pajevic 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://journals.viamedica.pl/fovia_morphologica/article/view/55303).
https://journals.viamedica.pl/fovia_morphologica/article/view/55303

B2. Kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (M34)

1. Micev M, Ćosić-Micev M, Todorović V, **Krsmanović M**, Krivokapić Z, M34 Popović M, Barišić G, Marković V, Jelić-Radošević LJ, Popov I. (2004) Histopathology of residual rectal carcinoma following preoperative radiochemotherapy. IX Central European Congress of Coloproctology and IV Symposium of Yugoslav Coloproctology, Beograd, October 7-9, 2004. ActaChirurgIugoslav 2004; 51:99-108.
2. Todorović V, **Krsmanović M**, Krstevski V, Đuričić S, Micev M. (2004) M34 Immuno-localization of BRCA1 protein in women with sporadic breast invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. 11th Congress of Pathology of Serbia and Montenegro with International Participation, Zlatibor, May 23-26, 2004. Arch Oncol, 12 (Suppl. 1):112.
3. Ćosić-Micev M, Micev M, Todorović V, **Krsmanović M**, Drndarević M, M34 Dugalić V, Knežević S, Jovanović I. (2004) Cystic dystrophy of pancreatic heterotopia of the duodenal wall: its relation to mioepithelial hamartoma. 11th Congress of Pathology of Serbia and Montenegro with International Participation, Zlatibor, May 23-26, 2004. Arch Oncol, 12 (Suppl 1):115.
4. **Krsmanović M**, Micev M, Todorović V, Ćosić-Micev M, Drndarević N. M34 (2004) Prognostic significans of PCNA and Ki67 labeling indices in gastrointestinal stromal tumors. 11th Congress of Pathology of Serbia and Montenegro with International Participation, Zlatibor, May 23-26, 2004. Arch Oncol, 12 (Suppl. 1):116.

5. **Krsmanovic M**, Todorović V, Micev M, Krstevski V, Đuričić S. (2006) M34
Clinicopathological and molecular characterization of invasive breast carcinomas. 12th Congress of Pathology of Serbia and Montenegro with International Participation, Palić, May 31-Jun 3, 2006. *Materia Medica*, 22 (Suppl. 1):74.
6. Micev M, Ćosić-Micev M, **Krsmanović M**, Jovanović I, Špuran M. (2006) M34
Staging and grading of chronic gastritis: interobserver variation in the histopathological assessment. 12th Congress of Pathology of Serbia and Montenegro with International Participation, Palić, May 31-Jun 3, 2006. *Materia Medica*, 22 (Suppl. 1):74.
7. Micev M, Todorovic V, Drndarevic N, Cosic-Micev M, Mitrovic O, **Krsmanovic M**, Pesko P, Heinrich M. (2007) M34
Prognostic implications of immunoexpression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumours. 21st European Congress of Pathology, Istanbul, Turkey, September 8-13, 2007. *Virchows Arch*, 451:315-315.
8. **Pajević M**, Stančić A, Golić I, Markelić M, Veličković K, Janković A, M34
Vučetić M, Otašević V, Buzadžić B, Korać B, Korać A. (2013)
Remodeliranje mitohondrija acinusnih ćelija pankreasa pacova u dijabetesu indukovanom aloksanom. Drugi kongres – Život sa slobodnim radikalima: Hemija, Biologija, Medicina. Niš, Srbija, 28. septembar 2013, P31, pp. 69, 2013.
9. Aleksic M, **Pajevic M**, Golic I, Otasevic V, Stancic A, Jankovic A, Korac M34
B, Korac A. (2015) The remodeling of rat Langerhans islets in induced hyperinsulinemia. 12th Multinational Congress on Microscopy - MCM2015, Eger, Hungary, August 23-28, 2015, PO-231, pp. 362-363.
10. **Pajevic M**, Aleksic M, Golic I, Markelic M, Jankovic A, Otasevic V, M34
Stančić A, Korac B, Korac A. (2017) Insulin-induced appearance of bi-hormonal (glucagon+insulin+) cells in rat pancreatic islets: immunofluorescent and immunogold studies. 13th Multinational Congress on Microscopy, Rovinj, Croatia, September 24-29, 2017. PO – PL2-6, pp. 237.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора мр Мила Ј. Пајевић

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване инсулином“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 19. априла 2018. год.

Мила Пајевић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора мр Мила Пајевић

Број индекса _____

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване
инсулином“

Ментори 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“


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 19. априла 2018. год.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Морфолошке промене егзокриног панкреаса пацова изазване инсулином“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 19. априла 2018. год.


Miro Stajčić

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.