

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Mirela Ukropina

**UTICAJ ISHRANE OBOGAĆENE
UGLJENIM HIDRATIMA NA
MORFOLOŠKE I ULTRASTRUKTURNE
ODLIKE PANKREASA PACOVA U
USLOVIMA EKSPERIMENTALNO
INDUKOVANOG HIPOTIREOIDIZMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Mirela Ukropina

**UTICAJ ISHRANE OBOGAĆENE
UGLJENIM HIDRATIMA NA
MORFOLOŠKE I ULTRASTRUKTURNE
ODLIKE PANKREASA PACOVA U
USLOVIMA EKSPERIMENTALNO
INDUKOVANOG HIPOTIREOIDIZMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirela Ukropina, MSc

**THE EFFECT OF CARBOHYDRATE RICH
DIET ON RAT PANCREAS
MORPHOLOGICAL AND
ULTRASTRUCTURAL
CHARACTERISTICS IN
EXPERIMENTALLY INDUCED
HYPOTHYROIDISM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentor:

dr Maja Čakić Milošević, docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Vesna Koko, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Radmila Glišić, docent Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu

Datum odbrane:

Mentoru, dr Maji Čakić Milošević, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu zahvaljujem na detaljnoj, prijateljskoj i stručnoj pomoći u izradi ove teze.

Članovima komisije, dr Vesni Koko, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu najtoplije zahvaljujem na dobronamernom usmeravanju i dragocenoj pomoći tokom izrade ovog rada, i dr Radmili Glišić, docentu Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu najsrdačnije zahvaljujem na pažljivom čitanju teksta i korisnim sugestijama koje su dovele do njegovog konačnog uobličavanja.

Svojoj porodici dugujem neizmernu zahvalnost za motivaciju, strpljenje, veru i moralno-logističku podršku :)

**Uticaj ishrane obogaćene ugljenim hidratima
na morfološke i ultrastrukturalne odlike pankreasa pacova
u uslovima eksperimentalno indukovano hipotireoidizma**

Rezime

Pankreas je žlezda sa egzokrinom i endokrinom funkcijom. Proizvodi njegove egzokrine komponente od vitalnog su značaja za proces varenja hrane. Endokrine ćelije pankreasa grupisane u Langerhansova ostrvca proizvode insulin i glukagon, hormone koji regulišu metabolizam pre svega ugljenih hidrata i neophodni su za održavanje optimalne koncentracije glukoze u krvi. Sekretorna aktivnost pankreasa, naročito njegove endokrine komponente, pod kontrolom je kompleksnih endokrinih, parakrinih i neuralnih mehanizama.

Hormoni tireoidne žlezde ključni su regulatori bazalnog metabolizma, rasta i razvića. Potrebni su za normalno funkcionisanje gotovo svih organa i organskih sistema, a njihov značaj u metabolizmu ugljenih hidrata poznat je već decenijama. Funkcije endokrinog pankreasa i tireoidne žlezde, kao i efekti koje ostvaruju njihovi hormoni, uzajamno su povezani i međusobno zavisni. U kliničkoj praksi relativno je česta koegzistencija disfunkcije tireoidne žlezde i razvoj insulinske rezistencije, koja je predvorje nastanka dijabetesa tipa 2.

Ishrana bogata prostim šećerima, uz smanjen nivo fizičke aktivnosti karakteristika je savremenog načina života, naročito u industrijski razvijenijim zemljama sveta. Pri kontinuiranom unosu ugljenih hidrata pankreas radi pod povećanim opterećenjem, intenzivno proizvodeći insulin, što dugoročno gledano može dovesti do patofizioloških procesa na nivou unutarćelijskih organela i eventualno do gubitka β -ćelija, odnosno do dijabetesa tipa 2.

Osnovni cilj ove teze bio je da se detaljnom analizom stekne uvid u morfo-funkcionalne karakteristike pankreasa pacova pod uticajem ishrane obogaćene saharozom, u uslovima sistemskog hipotireoidizma indukovano metimazolom.

U tronedeljnom eksperimentu korišćeni su mužjaci albino pacova Wistar soja, držani pod standardnim laboratorijskim uslovima. Životinje su u odnosu na ponuđeni rastvor u vodi za piće podeljene u četiri grupe. Kontrolna grupa životinja pila je čistu česmensku vodu, hipotireoidizam je indukovano 0.02% rastvorom metimazola, dok je

pankreas funkcionalno opterećen unosom 10% rastvora saharoze. Pacovi poslednje grupe pili su kombinovani rastvor metimazola i saharoze, već pomenutih koncentracija.

Pankreas je na uobičajen način pripremljen za morfološku i stereološku analizu na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije. Pored rutinskih metoda bojenja hematoksilinom i eozinom, toluidin plavim i AZAN-om, korišćene su metode imunohistohemije za detekciju insulina, glukagona, somatostatina, pankreasnog polipeptida, PDX1, α -SMA i Ki67 proteina, kao i specifično bojenje propidijum jodidom.

Dobijeni rezultati pokazali su sledeće:

- Tronedeljni tretman metimazolom doveo je do uspostavljanja umerenog sistemskog hipotireoidizma, nezavisno od režima ishrane. Nivoi tireoidnih hormona u cirkulaciji bili su smanjeni, a životinje su zaostajale u rastu.

- Kod hipotireoidnih životinja, bez obzira na način ishrane, ukupan energetski unos bio je smanjen usled sniženja stope bazalnog metabolizma i smanjenja energetskih potreba organizma. Energetski unos eutireoidnih životinja kojima je ponuđen rastvor saharoze bio je znatno iznad kontrolnih vrednosti i to prevashodno na račun ugljenih hidrata, ali se to nije negativno odrazilo na homeostazu glukoze.

- Manja apsolutna masa pankreasa životinja svih eksperimentalnih grupa posledica je proporcionalnog smanjivanja egzokrine i endokrine komponente pankreasa, koje se kod obe grupe hipotireoidnih životinja dešavalo paralelno sa manjim prirastom životinja. Smanjenje relativne mase pankreasa eutireoidnih životinja prehranjivanih saharozom delom je bilo posledica blagog povećanja telesne mase, a moguće delom i promena na nivou ćelijske degranulacije/egzocitoze.

- Rezultati morfološke analize pokazali su da je sintetska i sekretna aktivnost egzokrinog pankreasa eutireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze bila povišena u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Mehanički efekat zapremine želudačnog i crevnog sadržaja imao je ključnu regulatornu ulogu u ovim procesima.

- Egzokrini pankreas hipotireoidnih normalno hranjenih životinja bio je u stanju niže aktivnosti, zbog opšteg sniženja metaboličkih procesa i manjeg unosa hrane. U acinusnim ćelijama aktivirani su mehanizmi zimofagije kao zaštite od unutraćelijske aktivacije digestivnih enzima i autodigestije.

- Acinusne ćelije egzokrinog pankreasa hipotireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze bile su izložene većem izazovu nego ćelije normalno hranjenih životinja, kojem su uglavnom uspešno izlaze u susret, uz blage morfo-funkcionalne adaptacije. Pojedinačne ćelije trpele su stres endoplazminog retikuluma i, moguće, podlegle ireverzibilnim oštećenjima.

- Primenjeni tretman nije doveo do promene zastupljenosti i distribucije pojedinih tipova endokrinih ćelija u Langerhansovim ostrvcima.

- Kod normalno hranjenih hipotireoidnih životinja postojao je zastoj u sintezi/sekreciji insulina, manifestovan akumulacijom sitnijih granula u β -ćelijama, koji je donekle kompenzovan sintetskom aktivnošću ćelija koje ko-eksprimiraju insulin i glukagon.

- β -ćelije životinja koje su unosile rastvor saharoze, bez obzira na tireoidni status, većinom su bile funkcionalne insulin-produkujuće ćelije. Kod eutireoidnih životinja nalazile su se u stanju pune sintetske i sekretne aktivnosti, ali bez hipertrofije i hiperplazije.

- U grupi eutireoidnih saharozom prehranjivanih pacova detektovane su i ekstrainsularne β -ćelije u acinusima, koje trenutno nisu bile funkcionalne u sintezi i sekreciji insulina, i koje predstavljaju rezervne insulinske ćelije. Najverovatniji put nastanka ovih ćelija je transdiferencijacijom acinusnih ćelija.

- Unos rastvora saharoze finu strukturu β -ćelija hipotireoidnih pacova udaljava od grupe tretirane samo metimazolom i približava je kontroli, što se naročito manifestuje ultrastrukturno-stereološkim odlikama granula.

- Negativan efekat metimazola na sintezu i sekreciju insulina, uz istovremeno povećanje zahteva za ovim hormonom usled unosa saharoze, aktivirao je mehanizme koji produžavaju poluživot insulina. To je dovelo do blagog rasta nivoa ovog hormona u krvi i stvaranja uslova za razvoj insulinske rezistencije.

Ključne reči: pankreas, hipotireoidizam, saharoza, acinusne ćelije, β -ćelije, svetlosna mikroskopija, imunohistohemija, elektronska mikroskopija, stereologija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelija i tkiva

UDK: 591.437:575.853]:[616.441-008.64+591.53.063]:599.323.45

The effect of carbohydrate rich diet on rat pancreas morphological and ultrastructural characteristics in experimentally induced hypothyroidism

Summary

The pancreas is a gland with both exocrine and endocrine function. The products of its exocrine component are vital to the food digestion. Its endocrine function is based on secretory action of several types of endocrine cells that cluster together to form islets of Langerhans. Some of them produce insulin and glucagon, hormones that regulate primarily carbohydrate metabolism and are essential for maintaining optimal blood glucose concentrations. Secretory action of the pancreas, especially its endocrine component, is controlled by a complex endocrine, paracrine and neural mechanisms.

Thyroid hormones are key regulators of the basal metabolism, growth and development. They are necessary for normal function of almost all organs and organ systems; their importance in the metabolism of carbohydrates has been known for decades. The functions of the endocrine pancreas and thyroid gland, and effects of their hormones are mutually connected and interdependent. In clinical practice the coexistence of thyroid dysfunction and the development of insulin resistance, which is a good prognostic factor for type 2 diabetes occurrence, is relatively frequent.

A diet rich in simple sugars, along with reduced physical activity is a feature of modern lifestyle in developed countries of the world. Continuous intake of carbohydrates represents a form of stress in which pancreas intensively produces insulin, which in the long term can lead to pathophysiological processes at the level of intracellular organelles, and eventually to loss of β -cells, i.e. to type 2 diabetes.

The aim of this work was to gain an insight into the detailed morpho-functional characteristics of the rat pancreas under the influence of sucrose rich diet, in terms of systemic hypothyroidism induced by methimazole.

The obtained results show that:

- Moderate systemic hypothyroidism was established after three-week methimazole treatment, regardless of the diet. Levels of thyroid hormones in the circulation were reduced, and the animals fell behind in growth.

- In hypothyroid animals, regardless of the diet, total energy intake was reduced due to lower basal metabolism rate and reduced energy requirements. In sucrose fed

euthyroid animals energy input was significantly above control values, primarily at the expense of carbohydrates, but negative impact on glucose homeostasis was not evident.

- Reduced absolute mass of the pancreas in all experimental animals resulted from the proportional reduction of exocrine and endocrine components of the organ, and in both groups of hypothyroid animals occurred in parallel with a smaller body mass gain. Pancreas relative mass reduction in the sucrose fed euthyroid animals was in part the consequence of a slight increase in body mass, and partially as we assume the result of the increased cell degranulation/exocytosis.

- The results of morphological analysis showed that exocrine pancreas of the euthyroid animals with sucrose diet was more active in synthesis and secretion than of control animals. The mechanic effect of the gastric and intestinal contents had a key regulatory role in these processes.

- Exocrine pancreas of normally fed hypothyroid animals was less active, due to a general reduction of metabolic processes and lower food intake. In acinar cells the zymophagy is initiated as a protection mechanism from digestive enzyme's activation and autodigestion.

- Acinar cells in sucrose fed hypothyroid animals were exposed to a greater load than the cells of normally fed animals. This challenge has been successfully overcome, with slight morpho-functional adaptations. In individual cells rER stress could lead to possibly irreversible damage.

- The applied treatment did not induce changes in the number and distribution of any cell type in the islets of Langerhans.

- In normally fed hypothyroid animals there is a delay in the insulin synthesis/secretion, manifested by accumulation of smaller granules in β -cells, which was somewhat compensated by synthetic activity of insulin and glucagon co-expressing cells.

- Most of the β -cells in sucrose consuming animals regardless of thyroid status were functional insulin-producing cells. In euthyroid animals they were active regarding synthesis and secretion, and no hypertrophy or hyperplasia was detected.

- In the sucrose fed euthyroid group of animals extra-insular acinar β -cells were detected. At that moment they were not functional in the synthesis and secretion of

insulin and could be considered the back-up cells. Most likely these cells originated by acinar cell transdifferentiation.

- Sucrose intake in hypothyroid rats distinguishes β -cells fine structure away from those treated only with methimazole and approaches them to the control, which is especially manifested by granule's ultrastructural and stereological features.

- The methimazole negative effect on the synthesis and secretion of insulin, with increased requirements for this hormone due to the intake of sucrose, activate the mechanisms that prolong the half-life of insulin. This led to a slightly increased insulin circulation level and created conditions for the development of insulin resistance.

Keywords: pancreas, hypothyroidism, sucrose, acinar cells, β -cells, light microscopy, immunohistochemistry, electron microscopy, stereology

Academic Expertise: Biology

Major in: Cell and Tissue Biology

UDC: 591.437:575.853]:[616.441-008.64+591.53.063]:599.323.45

SADRŽAJ

1. UVOD	1
<u>Egzokrini pankreas</u>	2
Histofiziologija egzokrinog pankreasa	4
<u>Endokrini pankreas</u>	5
Histofiziologija endokrinog pankreasa	6
<u>Varenje ugljenih hidrata</u>	8
Ishrana bogata ugljenim hidratima i endokrini pankreas	9
Posledice ishrane bogate ugljenim hidratima na egzokrini pankreas	12
<u>Biološki značaj tireoidnih hormona i dejodinacija</u>	12
Tireoidni hormoni i pankreas	13
2. CILJ	16
3. MATERIJAL I METODE	17
<u>Eksperimentalne životinje i primenjeni tretmani</u>	17
<u>Određivanje biohemijskih parametara</u>	17
<u>Priprema materijala za analizu na nivou svetlosne mikroskopije</u>	18
Bojenje tkiva hematoksilinom i eozinom	18
Bojenje AZAN-om	19
Imunohistohemija	19

Specifično prikazivanje apoptotskih promena propidijum jodidom	21
<u>Priprema materijala za pravljenje polutankih i ultratankih preseka</u>	21
Bojenje polutankih preseka	22
Kontrastiranje ultratankih preseka	22
<u>Stereološka ispitivanja</u>	22
Stereološka ispitivanja na nivou svetlosne mikroskopije	22
<i>Stereološka ispitivanja egzokrinog pankreasa</i>	22
<i>Stereološka ispitivanja endokrinog pankreasa</i>	24
<i>Stereološka ispitivanja Langerhansovih ostrvaca</i>	24
<i>Stereološka ispitivanja pojedinih endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca</i>	25
Stereološka ispitivanja na nivou elektronske mikroskopije	26
<u>Statistička obrada rezultata</u>	26
4. REZULTATI	27
<u>Eksperimentalne životinje i primenjeni tretman</u>	27
Efekat eksperimentalnih uslova na ishranu životinja i energetske unos	27
Dejstvo eksperimentalnih uslova na rast životinja, masu i volumen pankreasa	29
Uticaj uslova eksperimenta na koncentraciju odabranih biohemijskih parametara u serumu	31
Koeficijent insulina	33

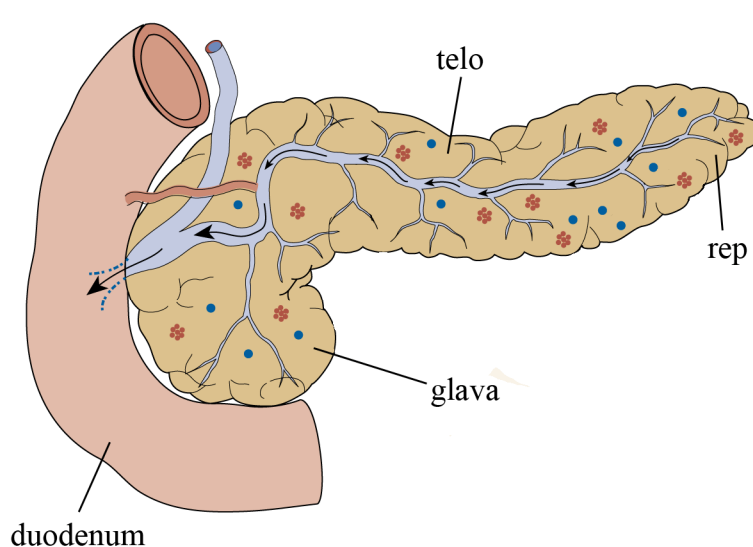
<u>Opšti plan građe organa</u>	34
<u>Egzokrini pankreas</u>	38
Histološka analiza egzokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije	38
<i>Specifično pokazivanje apoptotskih promena</i>	38
<i>Imunohistohemijska lokalizacija Ki67</i>	39
<i>Imunohistohemijska lokalizacija PDX1</i>	40
<i>Imunohistohemijska lokalizacija α-SMA</i>	41
Analiza egzokrinog pankreasa na nivou elektronske mikroskopije	42
<i>Nukleusi acinusnih ćelija</i>	42
<i>Sintetski aparat u acinusnim ćelijama</i>	43
<i>Zimogene granule</i>	46
<i>Vakuolizacija u acinusnim ćelijama</i>	47
<i>Druge ćelije egzokrinog pankreasa</i>	49
Stereološka analiza egzokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije	49
<u>Endokrini pankreas</u>	51
Histološka analiza endokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije	51
<i>Specifično pokazivanje apoptotskih promena</i>	51
<i>Imunohistohemijska lokalizacija Ki67</i>	52
<i>Imunohistohemijska lokalizacija PDX1</i>	54

<i>Imunohistohemijska lokalizacija insulina</i>	55
<i>Imunohistohemijska lokalizacija glukagona</i>	57
<i>Imunohistohemijska lokalizacija somatostatina i pankreasnog polipeptida</i>	59
Analiza endokrinog pankreasa na nivou elektronske mikroskopije	61
<i>β-ćelije</i>	62
<i>Ostale endokrine ćelije</i>	67
Stereološka analiza endokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije	69
<i>Stereološko ispitivanje Langerhansovih ostrvaca</i>	69
<i>Stereološka ispitivanja ćelija Langerhansovih ostrvaca</i>	72
Stereološka analiza β-ćelija endokrinog pankreasa na nivou elektronske mikroskopije	76
5. DISKUSIJA	79
<u>Analiza uslova eksperimenta</u>	79
<u>Uticaj eksperimentalnih uslova na masu životinja i masu pankreasa</u>	81
<u>Uticaj eksperimentalnih uslova na vrednosti biohemijskih parametara u serumu</u>	82
<u>Egzokrini pankreas</u>	84
Oblik i broj nukleusa u acinusnim ćelijama	84
Granulisani endoplazmin retikulum (gER) u acinusnim ćelijama	86
Zimogene granule	89

Vakuolizacija u acinusnim ćelijama	92
<u>Endokrini pankreas</u>	94
Da li su baš sve insulin-pozitivne β-ćelije funkcionalne?	96
Efekat eksperimentalnih uslova na morfo-funkcionalne odlike β-ćelija Langerhansovih ostrvaca	97
6. ZAKLJUČCI	103
<i>Egzokrini pankreas</i>	103
<i>Endokrini pankreas</i>	104
7. LITERATURA	106

1. UVOD

Pankreas (grč. *πάγκρεας*, pan- sve + *kréas*- meso) je žlezda pridružena digestivnom traktu, sa izdvojenom egzokrinom i endokrinom komponentom. Tokom embrionalnog razvića pankreas nastaje fuzijom dorzalne i ventralne evaginacije prednjeg creva. Ovaj organ nema dobro definisane anatomske delove, ali se na osnovu vaskulature može podeliti na glavu, telo i rep (Slika 1.1.). Pri tome veći deo pankreasa poreklom je od dorzalnog, dok samo donji deo glavenog regiona nastaje od ventralnog pupoljka embrionalnog creva (Kumar et al. 2005a).

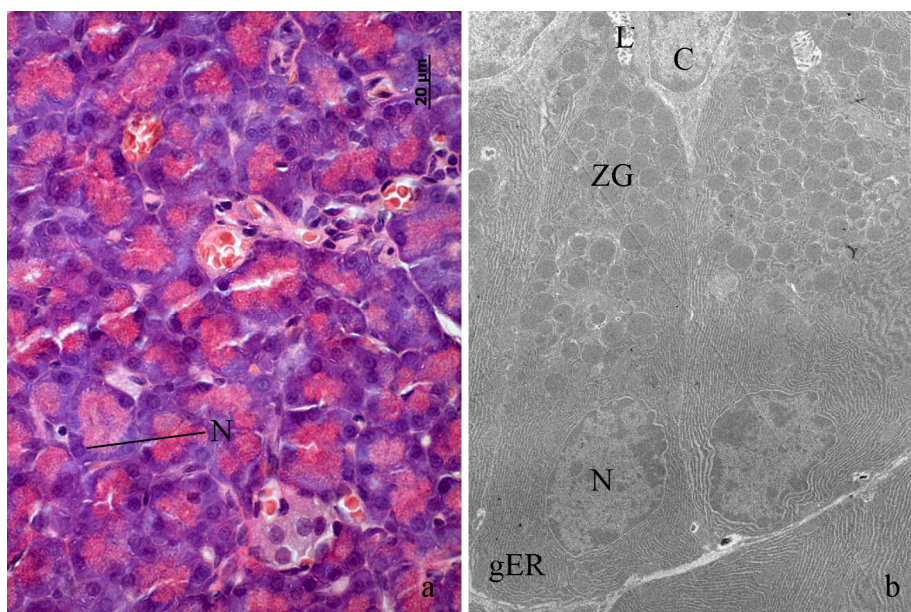


Slika 1.1. Delovi pankreasa: glava, telo i rep (preuzeto i modifikovano iz Apte et al. 1997)

Egzokrini deo žlezde proizvodi i u duodenum sekretuje digestivne enzime i čini veći deo pankreasa. Endokrini deo pankreasa predstavljen je klasterima ćelija, Langerhansovim ostrvcima, koja su raspoređena po egzokrinom pankreasu. Ćelije ostrvaca direktno u krv sekretuju hormone, koji prevashodno regulišu metabolizam ugljenih hidrata.

Egzokrini pankreas

Egzokrini pankreas je serozna žlezda organizovana u pankreasne lobuluse, u okviru kojih se nalaze acinusi – funkcionalne sekretne jedinice. Duž vezivno-tkivnih septi, koje povezuju lobuluse, pružaju se interlobularni izvodni kanali, krvni sudovi i nervni elementi. U vezivnom tkivu osim fibroblasta prisutni su i drugi tipovi ćelija, poput stelatnih ćelija. Ove ćelije nalaze se uz bazalni region acinusa i u mirujućem stanju odlikuje ih prisustvo lipidnih tela u citoplazmi. Po aktivaciji, stelatne ćelije gube lipide i preuzimaju ulogu u kolagenizaciji vezivnog tkiva.



Slika 1.2. Pankreas i tipična acinusna ćelija snimljeni na nivou svetlosne (a), odnosno elektronske mikroskopije (b). N-nukleus, gER-granulisani endoplazmin retikulum, ZG-zimogene granule, L-lumen acinusa, C-centroacinusna ćelija. (originalni snimci: a-hematoksilin i eozin, x63; b- x4400)

Acinusi su izgrađeni od piramidalnih acinusnih ćelija koje okružuju centralno pozicioniran lumen acinusa. Nukleus i granulisani endoplazmin retikulum (gER) najupečatljivije su organele u bazalnom delu ćelije, što doprinosi bazofiliji ovog regiona. Iznad nukleusa smešten je Goldži kompleks. U apikalnom delu ćelije nalaze se

brojne zimogene granule ispunjene sekretnim proizvodima ovih ćelija, i od njih potiče eozinofilija vršnog regiona acinusne ćelije (Slika 1.2.). Sadržaj zimogenih granula egzocitozom se izbacuje u lumen acinusa, odakle sistemom kanala dospeva do tankog creva (Kumar et al. 2005a).

Sistem izvodnih kanala pankreasa jedinstven je po tome što kanal najmanjeg dijametra, interkalarni kanal, polazi iz unutrašnjosti acinusa. Pločaste/kockaste ćelije ovog kanala često se na tkivnim presecima uočavaju kao svetlije obojene u samoj sredini acinusa, pa su i dobile ime centroacinusne ćelije. Interkalarni kanali nisu samo prosti prenosnici sekretovanog sadržaja. Epitelne ćelije ovih kanala učestvuju u transportu vode i bikarbonata u lumen, čime doprinose ukupnom volumenu pankreasnog soka. Interkalarni kanali nastavljaju se na intralobularne, koji imaju uglavnom kockaste epitelne ćelije, i takođe produkuju tečnost bogatu bikarbonatima (Case 1978). Više ovih kanala obrazuje interlobularni kanal koji se nalazi u okviru vezivno-tkivnih septi između lobulusa. Visina epitelnih ćelija koje oblažu lumen ovog kanala postepeno se duž kanala povećava. Interlobularni kanali prazne se u glavni pankreasni kanal, Virsungov kanal, koji se proteže čitavom dužom osom organa i postepeno povećava dijametar kako se u njega ulivaju dodatni interlobularni kanali. Često je u glavenom regionu pankreasa prisutan i pomoćni Santorinijev kanal. I glavni i pomoćni kanal prazne se u duodenum.

Veći krvni sudovi koji se prostiru duž vezivno-tkivnih septi granaju se do kapilara koji se nalaze u blizini acinusa. Endotel ovih kapilara je kontinuiran.

Pankreas je inervisan ograncima autonomnog nervnog sistema. Simpatička nervna vlakna kontrolišu protok krvi kroz pankreas, dok parasimpatička vlakna stimulišu aktivnost acinusnih i centroacinusnih ćelija. Ćelijska tela ganglijskih neurona koja se ponekad vide na presecima pankreasa pripadaju parasimpatičkim postganglijskim neuronima (Ross et al. 2003).

Histofiziologija egzokrinog pankreasa

U acinusnim ćelijama na poliribozomima gER-a sintetišu se brojni sekretorni proteini. Dalja obrada proteina odvija se u nivou Goldži kompleksa, da bi se sekretni proizvodi privremeno uskladištili u zimogenim granulama. Acinusne ćelije sintetišu i sekretuju brojne enzime za varenje proteina, lipida, ugljenih hidrata i drugih komponenti hrane. Među njima su proenzimi i enzimi tripsinogen, himotripsinogen, prokarboksipolipeptidaza, amilaza, pankreasna lipaza, holesterol esteraza i fosfolipaza (Fawcett 1994, Guyton and Hall 2006a). Kako bi se zaštitio integritet samog pankreasa enzimi se stvaraju u formi neaktivnih proenzima. Tako se najzastupljeniji enzim tripsin sintetiše u formi tripsinogena, koji se aktivira tek pod dejstvom enterokinaze u duodenumu. Kao dodatni mehanizam zaštite u granulama acinusnih ćelija nalazi se i inhibitor tripsina, protein koji se sintetiše istovremeno sa digestivnim enzimima (Arias et al. 1993, Fawcett 1994).

Niska stopa kontinuirane sekrecije pankreasa periodično se pojačava nakon hormonske stimulacije, a kao posledica unosa hrane. Prisustvo hrane u želucu i prolazak kiselog himusa u duodenum stimuliše oslobađanje dva gastrointestinalna hormona, sekretina i holecistokinina (CCK). Sekretin stimuliše ćelije interkalarnih kanala da sekretuju tečnost sa velikim udelom bikarbonatnih jona. Ova alkalna tečnost neutrališe kiselost himusa koji iz želuca ulazi u duodenum, kako bi se uspostavila pH vrednost optimalna za aktivnost pankreasnih enzima (Ross et al. 2003). Holecistokinin se vezuje za receptore na bazolateralnim regionima acinusnih ćelija i stimuliše ih na oslobađanje digestivnih enzima (Fawcett 1994). S obzirom na to da je strukturno sličan CCK-u i da je dokazano da interaguje sa jednom kategorijom njegovih receptora, moguće je da je u ovu stimulaciju uključen i gastrin (Scemama et al. 1987, Le Drean et al. 1999).

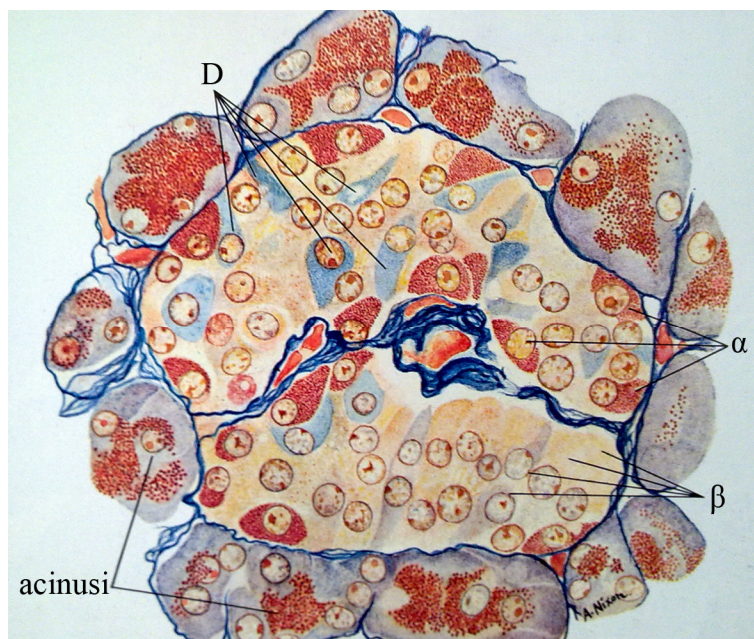
Poput sekretina i CCK, acetilholin koji se oslobađa iz nervnih završetaka parasimpatičkog nerva vagusa i drugih holinergičkih nerava enteričkog nervnog sistema spada u osnovne stimulatore sekrecije pankreasa. Međutim smatra se da je neuralna regulacija sekrecije pankreasa od manjeg značaja od humoralne (Fawcett 1994).

Endokrini pankreas

Endokrino tkivo pankreasa podeljeno je u diskretne ćelijske grupacije, Langerhansova ostrvca. Zbog svojih malih dimenzija, Langerhansova ostrvca zauzimaju svega 1-2 % zapremine žlezde. Iako ih ima po čitavom organu, najbrojnija su u repnom regionu pankreasa.

Langerhansova ostrvca mogu biti sačinjena od svega nekoliko, pa do više stotina ćelija. Poligonalne endokrine ćelije organizovane su u vidu kratkih nepravilnih traka između kojih se nalazi gusta mreža fenestrovanih kapilara (Ross et al. 2003). Ostrvca su tankim slojem retikularnih vlakana odvojena od okolnog egzokrinog pankreasa.

Do sada je u ostrvcima identifikovano nekoliko tipova ćelija. Najzastupljenije su β -, α -, D- i PP-ćelije, dok su D1-, EC- i ϵ -ćelije prisutne u manjem broju (Kumar et al. 2005b).



Slika 1.3. Distribucija α -, β - i D-ćelija u Langerhansovom ostrvcu (preuzeto i modifikovano iz Bloom and Fawcett 1968)

Od četiri glavna tipa ćelija β -ćelije su najbrojnije i nalaze se u centralnom regionu ostrvca, dok ostali tipovi ćelija zauzimaju uglavnom perifernu poziciju (Slika

1.3.). Sve ove ćelije imaju ultrastrukturnu organizaciju koja odgovara protein-sekretujućim ćelijama, ali gER ipak nije tako dobro razvijen kao kod acinusnih ćelija. Uz Goldži kompleks koji je smešten uz nukleus, najupadljivije unutarćelijske organele su svakako sekretne granule. Na nivou elektronske mikroskopije različiti tipovi ćelija mogu se identifikovati upravo po različitoj veličini, elektron-gustini i unutrašnjoj organizaciji sekretnih granula (Fawcett 1994).

U unutrašnjosti granula β -ćelija nalazi se višeučeno kristaloidno jezgro, koje je okruženo svetlim haloom. Granule α -ćelija su okrugle, a membrana blisko naleže na tamnu unutrašnjost. D-ćelije imaju velike, svetlije granule na koje blisko naleže membrana. PP-ćelije imaju male, tamne granule.

Histofiziologija endokrinog pankreasa

Varenjem ugljenih hidrata u digestivnom traktu većinom nastaje glukoza, koja se koristi 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 koji direktno ili indirektno utiče na funkcionisanje ćelija gotovo svih organa. Sintetiše se u formi prekursora, preproinsulina na poliribozomima gER-a. Posle odvajanja kratke signalne sekvence u cisterni gER-a nastaje proinsulin, koji se u okviru malih vezikula transportuje ka Goldži kompleksu. Finalna konverzija u insulin odvija se u vezikulama koje pupe sa trans strane Goldži kompleksa. Nakon koncentrovanja sadržaja nastaju sekretne granule koje se prazne procesom egzocitoze (Dodson and Steiner 1998).

Stimulus za sekreciju insulina je povećan nivo glukoze, nakon unosa hrane bogate ugljenim hidratima, kao i prisustvo nekih aminokiselina u obroku (posebno arginina i lizina). Insulin putem krvi dospeva do ciljnih ćelija gde se vezuje za receptore na ćelijskoj membrani, čija aktivacija pokreće događaje koji, između ostalog, dovode do ulaska glukoze u ćeliju.

Insulinski receptor je heterodimerni protein, tirozin kinaza, sastavljen od po dve α i β subjedinice. α subjedinice se nalaze izvan ćelije, ali su povezane disulfidnim mostovima sa β subjedinicama koje prolazeći kroz ćelijsku membranu prodiru u citoplazmu ćelije. Vezivanjem insulina za receptor aktivira se tirozin-kinazna aktivnost ovog receptora (Yip and Ottensmeyer 2003). Rezultat ove aktivacije je najpre autofosforilacija unutarćelijskih domena receptora, nakon čega sledi fosforilacija i drugih supstrata insulinskog receptora (IRS), čime se ostvaruje dejstvo insulina na različite biološke procese.

Nakon vezivanja liganda, kao i većina drugih receptora za hormone, i insulinski receptor se internalizuje endocitozom, formiranjem vezikula ogrnutih klatrinom ili na drugi način (Fan et al. 1982, McClain and Olefsky 1988, Fagerholm et al. 2009), čime se smanjuje količina insulina u krvi (Di Guglielmo et al. 1998). U kiseljoj sredini endozoma dolazi do disocijacije insulina sa kompleksa insulin-receptor; insulin se upućuje ka lizozomima na degradaciju a receptori se vraćaju ćelijskoj membrani (Carpentier 1994). Endocitoza hormonskih receptora povezana je sa endozomskom degradacijom liganda ili liganda i receptora, što uzrokuje nishodnu regulaciju receptora koja vodi ka smanjenoj osetljivosti ćelija i tkiva na hormon (Olefsky et al. 1982, Marshall 1985, Smith and Jarett 1988, Geiger et al. 1989). Međutim, moguće je da je endocitoza insulinskih receptora i deo signalnog puta, pošto je maksimalna aktivnost insulin receptorske kinaze uočena upravo u endozomskom kompartmentu (Di Guglielmo et al. 1998, Sorkin and von Zastrow 2002).

Glavna metabolička funkcija insulina je da ubrza i poveća transport glukoze u određene ćelije, povećavanjem broja raspoloživih GLUT 4 glukoznih transportera. Do toga dolazi nakon fuzije reciklirajućih endozoma, koji u svojoj membrani imaju glukozne transportere, sa ćelijskom membranom. Time se i do 10 puta povećava broj mesta za unos glukoze u ćeliju. Kada insulin više nije dostupan, deo membrane sa receptorima u vidu vezikula odvaja se od ćelijske membrane i vraća u unutrašnjost ćelije, odakle se opet može koristiti (Fawcett 1994, Guyton and Hall 2006b).

Glukagon je hormon koji se sintetiše u α -ćelijama, i takođe je uključen 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 (Fawcett 1994).

D-ćelije sadrže somatostatin koji suprimira oslobađanje insulina i glukagona. Pankreasni polipeptid sintetise se u PP-ćelijama i ima brojne efekte na gastrointestinalni trakt, poput stimulacije sekrecije želudačnih i crevnih enzima i inhibicije crevne peristaltike (Ross et al. 2003, Guyton and Hall 2006b).

D1-ćelije stvaraju vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP) koji je poput glukagona hiperglikemijski i glikogenolitički hormon; takođe stimuliše sekretornu aktivnost i peristaltiku creva. Enterohromafine (EC) ćelije sintetisu serotonin, koji stimuliše motilitet creva i sekreciju mukusa i digestivnih enzima, dok po podacima iz novije literature ϵ -ćelije stvaraju grelin, oreksigenički hormon (povećava apetit) (Ackermann and Gannon 2007).

Varenje ugljenih hidrata

Skoro svi ugljeni hidrati koji se koriste u ishrani nalaze se u formi polisaharida ili disaharida. Enzimski sastav pankreasnog soka može varirati u zavisnosti od kompozicije unete hrane (Snook 1971, Brannon 1990, Guyton and Hall 2006a). Tako na primer ishrana bogata ugljenim hidratima indukuje selektivnu proizvodnju amilaza, a smanjuje sintezu proteaza (Chowdhury et al. 2000, Pavelka and Roth 2005a). Pankreasna amilaza je enzim koji hidrolizuje kompleksne ugljene hidrata, pa od skroba i glikogena nastaju uglavnom disaharidi. U membrani mikroresica enterocita, koje oblažu površinu crevnih resica tankog creva, nalaze se enzimi koji su sposobni za konverziju disaharida na konstituentne monosaharide (Gray 1971). Jedan od tih enzima je saharaza, koja hidrolizuje saharozu do glukoze i fruktoze. Po apsorpciji i prolasku kroz enterocite, monosaharidi se krvotokom transportuju do jetre, gde se uz pomoć odgovarajućih enzima konvertuju do glukoze. Kada jetra oslobađa monosaharide natrag u krv, u pitanju je uglavnom glukoza, pa je zato preko 95% monosaharida u cirkulaciji u formi glukoze (Guyton and Hall 2006 c, d).

Kao što je već napomenuto, insulin znatno ubrzava olakšanu difuziju glukoze u većinu ćelija posredstvom membranskog proteina - glukoznog nosača. Ciljne ćelije za dejstvo insulina u prvom redu su poprečno-prugaste mišićne ćelije, i u manjoj meri adipociti, dok se unos glukoze u ćelije jetre i mozga odvija nezavisno od insulina. U jetri, glukoza se transformiše u glikogen, iz koga se kasnije otpušta kako bi se održala normoglikemija između obroka. U mišićnim ćelijama glukoza se čuva u vidu glikogena ili se metaboliše do ATP-a, a u masnom tkivu deponuje se u formi lipida. Kada nema insulina, količina glukoze koja ulazi u većinu ćelija je nedovoljna za normalno odvijanje metaboličkih procesa (Guyton and Hall 2006d).

Ishrana bogata ugljenim hidratima i endokrini pankreas

Ishrana bogata mastima i prostim šećerima, uz smanjen nivo fizičke aktivnosti, karakteristika je savremenog načina života, naročito u industrijski razvijenim zemljama. Rezultat ovoga je česta pojava različitih oboljenja, od gojaznosti i povišenog krvnog pritiska, do insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2.

Pri kontinuiranom dugotrajnom unosu ugljenih hidrata pankreas radi pod povećanim opterećenjem, intenzivno proizvodeći insulin. Nakon stimulacije glukozom, dolazi do pražnjenja insulinskih granula egzocitozom. Kako bi se sprečila potpuna degranulacija β -ćelija, koja bi dovela u pitanje mogućnost sekrecije insulina nakon hronične stimulacije, biogeneza insulinskih granula treba da se odvija u skladu sa brzinom egzocitoze (Hinke et al. 2004). Dakle, da bi se nadomestila rezerva insulina i da bi se održala ravnoteža između oslobađanja i unutarćelijskih zaliha, β -ćelije treba da ubrzaju sintezu svih konstituenata granula, i proteinskog sadržaja i membrana (Schuit et al. 1991). Brojne studije upućuju na to da je veliki broj gena, koji su povezani sa formiranjem sekretnih granula, pozitivno regulisan upravo glukozom (Guest et al. 1989, Knoch et al. 2004), kao uostalom i translacija u β -ćelijama (Schuit et al. 1988). Stimulacija biosinteze insulina i drugih komponenti sekretnih granula ubrzava punjenje gER-a proteinima koji treba da se nabiraju, savijaju. Da bi se sprečilo akumuliranje nesavijenih proteina, integrisani ćelijski odgovor, „odgovor na nesavijene proteine“ (Kaufman 2002), indukuje koordinisane promene u genskoj ekspresiji, što rezultira

većim kapacitetom za nabiranje. Bez ovog kompenzatornog odgovora, koji se odvija na nivou transkripcije i translacije, povećano opterećenje sintetskog aparata u β -ćelijama rezultovalo bi ozbiljnim stresom gER-a i nemogućnošću sekrecije insulina (Harding et al. 2001, Scheuner et al. 2001). Produžena stimulacija insulin-produkujućih β -ćelija može da uzrokuje da se fiziološki proces biosinteze insulina pretvori u patofiziološki proces na nivou unutarćelijskih organela, pre svega gER-a, što za krajnju posledicu može imati i gubitak β -ćelija.

Jedna od odlika populacije β -ćelija je različita osetljivost na glukozu, odnosno funkcionalna heterogenost. Prihvaćeno je da funkcionalna heterogenost β -ćelija postoji i kod pacova i kod ljudi (Pipeleers 1992, Pipeleers et al. 1994, Ling and Pipeleers 1996). Kod ljudi, povećan nivo glukoze prvo povlači za sobom smanjenje rezervi insulina, a zatim se povećava proporcija β -ćelija koje ostaju aktivirane nezavisno od akutnih varijacija u koncentraciji glukoze, čime se gubi funkcionalna heterogenost (Ling and Pipeleers 1996). Dakle, hronično povišen nivo glukoze indukuje stanje produžene aktivacije β -ćelija i njihovu povećanu osetljivost na glukozu. Time se zbog brzog pražnjenja rezervi insulina, smanjuje potencijal za sekreciju insulina nakon nove stimulacije glukozom, odnosno slabi sekretorni odgovor insulina (Robertson 1989, Leahy 1990, DeFronzo et al. 1992, Yki-Jarvinen 1992, Robertson et al. 1994, Weir and Leahy 1994, Ling and Pipeleers 1996, Ling et al. 1996).

Nakon dijabetogenog opterećenja pankreasa, poput dužih perioda hiperglikemije, formiranje novih β -ćelija (neogeneza) doprinosi povećanju mase β -ćelija a time se povećava i kapacitet za sintezu/sekreciju insulina (Finegood et al. 1995, Finegood et al. 1997, Lipsett and Finegood 2002). Ove ćelije ne moraju se nužno nalaziti u okviru Langerhansovih ostrvaca, već mogu biti pojedinačno asociirane uz acinuse (Lipsett and Finegood 2002). Nove β -ćelije formiraju se od prekursorskih ćelija epitela izvodnih kanala i/ili transdiferencijacijom drugih tipova ćelija, uključujući i acinusne ćelije (Lipsett and Finegood 2002). Takođe nisu nepoznati slučajevi, naročito tokom razvića pankreasa da se javljaju populacije ćelija koje koeksprimiraju insulin pored još nekog hormona endokrinog pankreasa (Movassat et al. 1997, Chung and Levine 2010). Osim neogenezom, masa β -ćelija može se aktivno prilagoditi povećanim

potrebama za insulinom povećanjem veličine ćelija i/ili povećanjem proliferacije i smanjenjem smrti β -ćelija (Bonner-Weir et al. 1989, Bonner-Weir 2000).

Pankreasne β -ćelije imaju impozantnu sposobnost da održavaju nivo glukoze u okviru uskih fizioloških granica tokom čitavog života jedinke. Međutim hronično povišena koncentracija glukoze u krvi može da dovede do insulinske rezistencije, odnosno stanja u kome insulin ne može da obezbedi adekvatan unos glukoze u periferna tkiva (Kahn and Flier 2000). Izgleda da je većina slučajeva insulinske rezistencije povezana sa smanjenim vezivanjem insulina za insulinske receptore i poremećajima u signalnom putu koji povezuje aktivaciju receptora sa mnogobrojnim unutarćelijskim efektima. Ovo podrazumeva smanjenu aktivnost insulinskih receptora, manju količinu aktivnih intermedijara u signalnom putu insulina, ali i poremećaje u translokaciji GLUT 4 reciklirajućih endozoma (Saltiel and Kahn 2001, Kumar et al. 2005b).

Insulinska rezistencija je deo čitave kaskade poremećaja koji se često označavaju kao „metabolički sindrom“. Pored insulinske rezistencije, odlike ovog sindroma su gojaznost i povećan nivo glukoze i triglicerida u krvi. Svi simptomi metaboličkog sindroma blisko su povezani sa prekomernom telesnom masom, koja nastaje kao posledica akumuliranja masnog tkiva naročito u abdomenu, oko visceralnih organa (visceralna gojaznost). Ovaj sindrom dovodi se u vezu sa nastankom bolesti kardiovaskularnog sistema, ali u isto vreme je i predispozicija za razvoj dijabetesa tipa 2 (Kahn and Flier 2000, Guyton and Hall 2006b). Insulinska rezistencija kod ljudi može postojati i po 10-20 godina pre ispoljavanja dijabetesa i smatra se dobrim prognostičkim faktorom za nastanak ovog oboljenja (Shulman 2000). Međutim, kod nekih ljudi i pored dugogodišnje insulinske rezistencije, gojaznosti i većih koncentracija glukoze posle obroka u odnosu na normalne vrednosti, ne dolazi do pojave dijabetesa tipa 2. Pankreas ovih ljudi očigledno je u mogućnosti da sintetise dovoljno insulina da spreči ozbiljne poremećaje metabolizma glukoze; postoje mišljenja da je ovakva sposobnost pankreasa genetički uslovljena (Guyton and Hall 2006b).

Smanjena osetljivost ciljnih tkiva na metaboličke efekte insulina, karakteristična za dijabetes tipa 2, remeti unos ugljenih hidrata i njihovo deponovanje u ćelije. Time se povećava nivo glukoze u krvi, što stimuliše kompenzatorno povećanje sekrecije insulina (Saltiel 2000, Guyton and Hall 2006b). U kasnijim fazama dijabetesa β -ćelije se

iscrpljuju i ne mogu da proizvedu dovoljno insulina kako bi se održala normoglikemija, naročito posle unosa hrane bogate ugljenim hidratima (Kumar et al. 2005b). U literaturi ima podataka da se u dijabetesu menja i morfologija β -ćelija. Promene idu u pravcu povećanja zastupljenosti gER-a, nezrelih granula i lizozoma, dok se volumenska gustina β -ćelija smanjuje (Gomez Dumm et al. 1989).

Posledice ishrane bogate ugljenim hidratima na egzokrini pankreas

U studijama sa infuzijom hiperosmotskim koncentracijama glukoze zabeleženo je da dolazi do smanjenja količine tečnosti u pankreasu (Raeder and Mathisen 1982). Kao posledica ovog smanjenja, mogu se javiti proteinski precipitati u izvodnim kanalima (Lipsett and Finegood 2002).

Insulin ima dugoročne efekte na regulaciju sinteze pankreasnih digestivnih enzima, i kratkoročne efekte kojima utiče na stimulaciju pankreasne sekrecije, i u fiziološkim i patološkim uslovima (Pap 2004). Tako, hipoinsulinemija dovodi do pankreasne atrofije i masne infiltracije egzokrinog pankreasa (Balk et al. 1975). Nasuprot tome, bilo endogeni ili egzogeno dodat insulin indukuju rast pankreasa i povećanje sinteze enzima (Adler and Kern 1975, Saito et al. 1980).

Biološki značaj tireoidnih hormona i dejodinacija

Dejstvo tireoidnih hormona kod sisara od presudnog je značaja u razviću, diferencijaciji tkiva i održanju metaboličke homeostaze (Dentice and Salvatore 2011). Tireoidni hormoni (TH) su jodinirana jedinjenja koja utiču na gensku ekspresiju u bukvalno svim ćelijama vertebrata (Dentice and Salvatore 2011). Svoju funkciju ostvaruju posredstvom nukleusnih receptora (TR) za koje se vezuje biološki aktivan hormon štitne žlezde, trijodtironin (T3). Smatra se da tireoidni hormoni svoje metaboličke efekte ostvaruju posredstvom jedne od četiri izoforme receptora za tireoidne hormone, TR α 1 (Boelen 2009). Pošto su TR zapravo transkripcioni faktori, time se direktno utiče na ekspresiju gena (Ledda-Columbano et al. 2005).

Transport tireoidnih hormona kroz ćelijsku membranu bitan je korak u njihovom dejstvu. Nedavno su identifikovani TH-transportni proteini koji olakšavaju unos tireoidnih hormona u ćelije (Visser et al. 2008).

Minimalno aktivan tiroksin (tetrajodtironin, T4) dejodinacijom se konvertuje u T3, preferencijalni ligand za receptore tireoidnih hormona. Uklanjanje jednog atoma joda sa fenolnog prstena katalizuju jodotironin dejodinaze, D1 i D2. Savremena koncepcija delovanja TH sugeriše da i pored nepromenjene koncentracije TH u krvi, dejstvo tireoidnih hormona na lokalnom nivou može biti izmenjeno zbog postojanja dejodinacije (Dentice and Salvatore 2011).

Tireoidni hormoni i pankreas

Izmenjen tireoidni status utiče na mnoga tkiva i organe, uključujući i pankreas (Lu et al. 1988, Lee et al. 1989). Poznato je da tireoidni hormoni imaju značajan uticaj na glukoznu homeostazu. Oni stimulišu praktično sve segmente metabolizma ugljenih hidrata, uključujući unos glukoze u ćelije, glikolizu, glukoneogenezu, apsorpciju u nivou gastrointestinalnog trakta, pa čak i sekreciju insulina sa svim posledičnim efektima na metabolizam ugljenih hidrata. Svi ovi efekti verovatno su rezultat opšteg porasta količine enzima uključenih u ove metaboličke puteve pod uticajem tireoidnih hormona (Guyton and Hall 2006e).

Primarni stimulus za sekreciju insulina, ali i za transkripciju gena za insulin i translaciju tako nastale iRNK, je povećanje nivoa glukoze u krvi (Permutt and Kipnis 1972, Goodison et al. 1992). Ekspresiju gena za insulin na molekularnom nivou stimulišu određeni transkripcioni faktori, među kojima su i PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox-1) i NeuroD1 (neurogenic differentiation 1). Oba faktora neophodna su za održanje funkcije zrele β -ćelije (Andrali et al. 2008, Kaneto et al. 2009). Mnogi hormoni, uključujući i T3 pozitivno regulišu ove transkripcione faktore (Campbell and Macfarlane 2002, Lin and Sun 2011).

Do sada publikovani podaci koji se tiču koncentracije insulina u krvi u hipotireoidizmu, najčešćem poremećaju funkcije štitne žlezde, prilično su nekonzistentni i često kontradiktorni.

U literaturi, smanjen nivo insulina u krvi pri sistemskom hipotireoidizmu tumači se postojanjem negativne regulacije sekrecije insulina iz β -ćelija (Katsilambros et al. 1972, Lenzen and Bailey 1984, Cortizo et al. 1985, Gomez Dumm et al. 1985, Ramos et al. 1998, 2001). Sa druge strane postoje indicije da se u hipotireoidizmu poboljšava dejodinicija tiroksina, kako bi se održao nivo biološki aktivnog T3 hormona, koji ubrzava metabolizam glukoze i povećava insulinom posredovan unos i skladištenje glukoze u skeletne mišiće i masno tkivo (Kohrle 2000).

Međutim, postoje i podaci da smanjena funkcija štitne žlezde može povećati koncentraciju insulina, putem direktnog dejstva TH na povećanje osetljivosti ćelija ostrvaca na glukozu i/ili smanjenom stopom degradacije insulina (Elgee and Williams 1955). Kod ljudi smanjena stopa degradacije insulina u hipotireoidizmu smanjuje potrebu za insulinom. Tako, iako je sekrecija insulina smanjena, održava se normoglikemija zbog dužeg poluživota insulina (Handisurya et al. 2008).

Moguće je da je ova nekonzistentnost podataka posledica različitih eksperimentalnih uslova, starosti životinja, ali ne sme se potpuno isključiti ni uticaj iznenađujuće varijabilnosti u osetljivosti tkiva na glukozu/insulin i tireoidne hormone među pojedinim jedinkama (Heath et al. 1977).

Hipotireoidizam je praćen i brojnim poremećajima u metabolizmu lipida, uključujući povišen nivo triglicerida i LDL holesterola (Wu 2000).

U literaturi postoje podaci koji hipotireoidizam dovode u vezu sa pojavom insulinske rezistencije (Brenta et al. 2009, Brenta 2011), čime se stvara pogodan teren za nastanak dijabetesa. Koegzistencija poremećaja funkcije štitne žlezde i dijabetesa pokazana je i u kliničkoj praksi (Wu 2000).

Metimazol je antitireoidni lek koji inhibira sintezu hormona štitne žlezde. Često se koristi u humanoj medicini za lečenje hipertireoidizma, ali i za indukovanje hipotireoidizma u eksperimentalnim uslovima. U literaturi postoje podaci koji govore o

zaštitnom dejstvu hipotireoidizma u akutnom pankreatitisu (Zhang et al. 1992a), ali i o tome da metimazol može pogoršati pankreatitis (Taguchi et al. 1999).

Pankreatitis je zapaljensko oboljenje pankreasa, čija etiologija nije sasvim razjašnjena. Na nivou acinusnih ćelija pankreatitis ima odlike bolesti lizozomskog sistema, odnosno prisutne su velike autofagne vakuole sa delimično razloženim sadržajem (Mareninova et al. 2009). Dve glavne patološke promene acinusnih ćelija u pankreatitisu su formiranje vakuola i aktivacija tripsinogena (Mareninova et al. 2009). Acinusne ćelije koje stvaraju proteolitičke enzime simultano sekretuju i inhibitor tripsina, koji sprečava aktivaciju tripsina unutar ćelija i u kanalima pankreasa. U slučaju aktivacije digestivnih enzima pre dospeća u lumen creva, dolazi do digestije tkiva pankreasa, odnosno do pankreatitisa (Guyton and Hall 2006a). Smatra se da se aktivacija pankreasnih enzima, njihovo oslobađanje u intersticijum, formiranje slobodnih radikala i oslobađanje hemoatraktanata koji privlače heterofilne granulocite u oblast inflamacije nalaze u osnovi patofiziologije ovog potencijalno letalnog oboljenja (Banks 1997). Tireoidni hormoni mogu imati ulogu u svakom od ovih patoloških događaja (Yonetci et al. 2002). Interesantno je da ukoliko patološke promene karakteristične za pankreatitis otpočinu, tada ga i fiziološke doze tireoidnih hormona mogu pogoršati (Zhang et al. 1992a, b).

Do pojave pankreatitisa može doći i nakon opstrukcije izvodnih kanala proteinskim precipitatima, a kao posledica hiperosmotske ishrane (Friess et al. 1998).

2. CILJ

Osnovni cilj ove teze bio je da se detaljnom analizom stekne uvid u morfo-funkcionalne karakteristike pankreasa pacova pod uticajem ishrane obogaćene saharozom, u uslovima sistemskog hipotireoidizma indukovano metimazolom.

Analizirani su prevashodno morfološki aspekti adaptacije pankreasa na izmenjenu homeostazu, ali praćene su i tumaćene promene relevantnih biohemijskih parametara krvi, kao što su nivoi insulina i tireoidnih hormona, glukoze i triglicerida.

Na nivou svetlosne mikroskopije proučavani su preparati koji pružaju uvid u opštu histološku građu pankreasa pod precizno definisanim eksperimentalnim uslovima. Stereološkom analizom utvrđena je zastupljenost pojedinih histoloških konstituenata u građi pankreasa, broj i masa Langerhansovih ostrvaca i pojedinačnih endokrinih ćelija u okviru njih.

Primenom imunohistohemijskih metoda dobijene su informacije o sintetskoj aktivnosti i funkcionalnom statusu pojedinih endokrinih ćelija, prisustvu aktiviranih stelatnih ćelija, a u kombinaciji sa primenom propidijum jodida praćena je dinamika populacije ćelija egzokrinog i endokrinog pankreasa.

Ultrastrukturalne promene ćelija pankreasa izazvane specifičnim uslovima eksperimenta izučavane su na nivou transmisiona elektronske mikroskopije. Analizirano je u kojim pravcima se odvija remodeliranje, prevashodno acinusnih i β -ćelija, i utvrđivano je koji su ćelijski procesi favorizovani, a koji usporeni. Stereološkom analizom brojnosti i veličine sekretiranih granula β -ćelija dobijen je uvid ne samo u sintetsku, već i u sekretirnu aktivnost ovih ćelija, u eksperimentalnim uslovima koji antagonistički deluju na regulaciju funkcije pankreasa.

Sveobuhvatnom morfološkom analizom pankreasa i njegovih ćelija sa egzokrinom i endokrinom funkcijom, dobijen je uvid o pravcima i modalitetima strukturnog prilagođavanja pankreasa na povećano funkcionalno opterećenje u uslovima narušenog tireoidnog statusa.

3. MATERIJAL I METODE

Ekperimentalne životinje i primenjeni tretmani

Mušjaci pacova Wistar soja stari 8 nedelja, prosečne telesne mase 210 ± 35 g korišćeni su u eksperimentu koji je trajao tri nedelje. Životinje su bile prilagođene na dvanaestočasovnu dnevno-noćnu ritmiku i držane su na temperaturi od 21 ± 1 °C. Pet dana pre početka tretmana pacovi su pojedinačno raspoređeni u plastične kaveze kako bi se privikli na solitarnost. Životinje su hranjene standardnom hranom za laboratorijske pacove, u peletiranom obliku (Veterinarski zavod Subotica, Srbija).

U zavisnosti od tečnosti koju su pile *ad lib*, životinje su podeljene u četiri grupe. Kontrolna (K, n=6) grupa životinja pila je česmensku vodu, životinje tretirane metimazolom (M grupa, n=6) unosile su 0.02% rastvor metimazola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u česmenskoj vodi, dok je saharoznoj (S, n=8) grupi davano da piju 10% rastvor saharoze (BioChemika Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u česmenskoj vodi. Pacovi poslednje (MS, n=8) grupe pili su kombinovani rastvor metimazola i saharoze u česmenskoj vodi, istih koncentracija kao i M, odnosno S grupa. Tokom tretmana praćen je i meren unos tečnosti i hrane na osnovu koga je preračunat ukupni dnevni energetske unos. Standardna hrana imala je energetske vrednost od 11 kJ/g, a saharoza ima 16.7 kJ/g.

Životinje su gajene u skladu sa preporukama za negu laboratorijskih životinja, a ekperimentalni tretman odobrio je Etički komitet Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Dvadeset drugog dana eksperimenta, u prepodnevnim časovima životinjama je izmerena telesna masa, a zatim su žrtvovane dekapitacijom.

Određivanje biohemijskih parametara

Prilikom žrtvovanja sakupljena je krv iz trupa životinja, koja je ostavljena 30-45 minuta na sobnoj temperaturi da koaguliše. Zatim je centrifugirana 10 minuta na 3000 obrtaja po minuti, kako bi se izdvojio serum u vidu supernatanta.

Koncentracije glukoze i triglicerida u serumu određivane su spektrofotometrijski (GOD-PAP, odnosno PAP metodom), dok je RIA metod služio za merenje koncentracija insulina, ukupnog trijodtironina (T3) i tiroksina (T4) u serumu (INEP, Zemun, Srbija).

Priprema materijala za analizu na nivou svetlosne mikroskopije

Pankreas je izolovan, na ledu očišćen od okolnog vezivnog i masnog tkiva i fiksiran u 10% (v/v) rastvoru formalina u 0.1 M fosfatnom puferu, pH 7.4. Izmerena je masa pankreasa, a zatim je svaki organ podeljen na 8 približno jednakih delova. Prema sistematično nasumičnom uzorkovanju (Gundersen and Jensen 1987) svaki drugi komad tj. blok tkiva ukalupljen je u parafin. Iz preostalih delova organa uzimani su isečci za kalupljenje za elektronsku mikroskopiju.

Sprovođenje tkiva do parafina podrazumevalo je ispiranje od formalina tokom noći u tekućoj vodi. Materijal je zatim dehidratisan kroz seriju rastvora etanola rastućih koncentracija (od 30% do 100%), prosvetljen u ksilolu i ukalupljen u Bioplast.

Parafinski kalupi tkiva sečeni su rotacionim mikrotomom Spencer (No. 820, American Optical Company, Buffalo, NY, USA). Preseci debeli 5 μ m nanošeni su na želatinizirane ili SuperFrost predmetne pločice i zatim bojeni na odgovarajući način, radi analiziranja na svetlosnom mikroskopu.

Bojenje tkiva hematoksilinom i eozinom

Preseci tkiva bojeni hematoksilinom i eozinom služili su za proučavanje opšteg plana građe organa. Pre bojenja sa preseka tkiva morao je da se ukloni parafin, koji je olakšavao njegovo sečenje, i preseci „dovedu do vode“ kako bi se omogućilo njihovo bojenje bojama rastvorljivim u vodi. Ovo je podrazumevalo deparafinisanje tkiva u ksilolu (dve promene po 5 min), i rehidraciju preseka kroz nekoliko rastvora etanola opadajućih koncentracija (od 100% do 70%, po 5 min), do destilovane vode. Zatim su preseci bojeni sveže profiltriranim hematoksilinom, pa potom i eozinom. U cilju

dobijanja trajnih preparata uzorci su dehidratirani sprovođenjem kroz 95% i 100% etanol, nakon čega je sledilo prosvetljavanje u ksilolu i montiranje u DPX-u.

Preseci obojeni hematoksilinom i eozinom posmatrani su na Zeiss AxioImager.M1 mikroskopu, i snimani kamerom AxioCam MRc5, uz korišćenje AxioVision 4.8 softvera.

Bojenje AZAN-om

Za stereološku analizu egzokrinog pankreasa korišćeni su preseci bojeni AZAN (skraćenica od AZokarmin-ANilin plavo) metodom. To je zapravo modifikovano trihromno bojenje po Malori-ju, 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. Ovim postupkom kolagena vlakna vezivnog tkiva boje se izrazito plavo, acinusi egzokrinog pankreasa karmin crveno, dok su Langerhansova ostrvca narandžasta.

Imunohistohemija

Sva imunohistohemijska bojenja izvedena su primenom LSAB (labeled streptavidin biotin) metode. Ova visokosenzitivna metoda podrazumeva upotrebu biotinizovanog sekundarnog antitela koje povezuje kompleks antigen/primarno antitelo sa streptavidin-peroksidaza konjugatom, koji postaje vidljiv nanošenjem odgovarajućeg hromogenog supstrata.

U ovoj metodi, posle standardne deparafinizacije i rehidratacije, pozadinsko i nespecifično bojenje tkiva smanjuje se na minimum blokiranjem aktivnosti endogene peroksidaze (primenom vodonik peroksida) i inkubacijom sa blokirajućim serumom. Zatim sledi inkubacija sa primarnim antitelima, adekvatnih razblaženja i u određenom trajanju.

Za demonstriranje β -, α -, D- i PP-ćelija inkubacija sa primarnim antitelima trajala je 60 minuta i odvijala se na sobnoj temperaturi. Prisustvo insulina u β -ćelijama detektovano je primenom monoklonskog antitela miša (mouse monoclonal NCL-insulin, Novocastra, razblaženja 1:100). Primarna poliklonska antitela zeca korišćena su za obeležavanje glukagona u citoplazmi α -ćelija (rabbit polyclonal A0565, Dako, 1:75), somatostatina u D-ćelijama (rabbit polyclonal A0566, Dako, 1:500) i pankreasnog polipeptida u PP-ćelijama (rabbit polyclonal A0619, Dako, 1:500).

Kako bi se uočile ćelije u nekoj od faza deobe korišćeno je monoklonsko antitelo miša Ki67 (M7248, DakoCytomation, 1:30). Inkubaciji sa primarnim antitelom (30 min na sobnoj temperaturi) prethodilo je otkrivanje epitopa primenom toplote (20 min u 10 mM citratnom puferu, pH 6 na 100 °C).

Primarno poliklonsko antitelo zeca PDX1 (rabbit polyclonal ab47267, Abcam, 1:750) upotrebljeno je za demonstriranje ćelija koje eksprimiraju ovaj transkripcioni aktivator gena za insulin (inkubacija preko noći, na 4 °C).

Kako bi se identifikovale eventualno aktivirane stelatne ćelije u pankreasu, na preseke je naneto primarno poliklonsko antitelo zeca za α -SMA (smooth muscle actin) (ab5694, Abcam, 1:400). Inkubaciji sa ovim antitelom (60 min, na sobnoj temperaturi) prethodilo je otkrivanje epitopa toplotom (15 min u 10 mM citratnom puferu, pH 6 na 100 °C).

Nakon završene inkubacije primarnim antitelima, na preseke je nanošeno biotinizovano sekundarno antitelo (anti-mišije i anti-zečije, Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC kit, ab64264, Abcam), pa zatim i streptavidin peroksidaza. Bojenje je završeno nakon inkubacije u rastvoru koji sadrži DAB i njegov supstrat. Nukleusi su kontra-obojeni Majerovim hematoksilinom, nakon čega je usledila dehidratacija, prosvetljavanje i montiranje preparata u DPX-u. Pod svetlosnim mikroskopom jasno se uočava braon obojeni proizvod reakcije.

Svi imunohistohemijski obojeni preparati posmatrani su na Leica DMRB svetlosnom mikroskopu i fotografisani korišćenjem JVC TK 1280E Video Camera (Leica) i QWin programa (Leica).

Specifično prikazivanje apoptotskih promena propidijum jodidom

Za demonstriranje prisustva mrtvih ćelija u tkivu, preseći su nakon deparafinizacije i rehidratacije inkubirani u vodenom rastvoru propidijum jodida (1mg/ml) 10 minuta, isprani u česmenskoj vodi i montirani u glicerolu. Propidijum jodid vezuje se za nukleuse svih ćelija, pošto je u pitanju tkivo fiksirano u formalinu. Međutim, apoptotske ćelije poseduju kondenzovane nukleuse koji se ovim postupkom boje intenzivnije crveno.

Preseći obojeni propidijum jodidom posmatrani su na fluorescentnom mikroskopu Zeiss Observer.Z1 i fotografisani AxioCam MR3 kamerom uz upotrebu AxioVision Rel4.7 softvera.

Priprema materijala za pravljenje polutankih i ultratankih preseka

Posle fiksacije pankreasa u formalinu, iseći tkiva veličine oko 1 mm³ uzimani su iz delova organa koji su preostali nakon odabira tkiva za sprovođenje do parafinskih kalupa za svetlosnu mikroskopiju. Uzorci tkiva ispirani su tokom tri dana u tri promene fosfatnog pufera, a zatim fiksirani u 2.5% rastvoru glutaraldehida u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4), 60 min na 4 °C. Potom je usledila jednočasovna postfiksacija tkiva u 1% rastvoru osmijum tetroksida u 0.1 M fosfatnom puferu. Tkivo je dehidratirano sprovođenjem kroz rastvore etanola rastućih koncentracija (50%, 70%, 96%, 100%), da bi se kasnije u tkivo postupno uvodio propilen oksid, najpre u 1:1 (v/v) rastvoru sa etanolom, a zatim čist. Propilen oksid istiskuje alkohol iz tkiva i omogućava prodiranje smola (Araldit). Prožimanje tkiva smolama takođe se obavljalo postepeno, izlaganjem tkiva najpre manje viskoznim, pa viskoznijim rastvorima smola (u rastvoru sa propilen oksidom, postupno je povećavan udeo smola), da bi se tkivo zatim prepustilo dejstvu čistog Araldita, u tri promene na 45 °C. Finalno kalupljenje tkiva u čistoj smoli trajalo je 72 sata, na 50 °C.

Ultramikrotomom Leica EM UC6 opremljenim staklenim nožem sečeni su preseći debljine 1 µm (polutanki, semi-fine preseći), koji su nanošeni na predmetne pločice i zatim bojani.

Na istom mikrotomu, ali dijamantskim (Diatome, Switzerland) nožem pravljene su ultratanki preseki debljine oko 100 nm, koji su nanošeni na bakar-paladijumske mrežice.

Bojenje polutankih preseka

Polutanki preseki bojeni su 1% rastvorom toluidin plavog u destilovanoj vodi, uz dodavanje rastvora Na-tetraborata. Ovi preseki služili su za analizu opšte histološke organizacije pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije, kao i za odabiranje najpogodnijeg mesta za ultrastrukturnu analizu.

Polutanki preseki posmatrani su na Leica DMRB svetlosnom mikroskopu i fotografisani korišćenjem JVC TK 1280E Video Camera (Leica) i QWin programa (Leica).

Kontrastiranje ultratankih preseka

Ultratanki preseki kontrastirani su uranil acetatom i olovo citratom u Leica EM STAIN (Leica Microsystems, Germany) aparatu za automatsko kontrastiranje. Ovako pripremljen materijal posmatran je na Philips CM 12 transmisionom elektronskom mikroskopu (FEI, The Netherlands) i fotografisan SIS MegaView III CCD digitalnom kamerom (Olympus Soft Imaging Solutions).

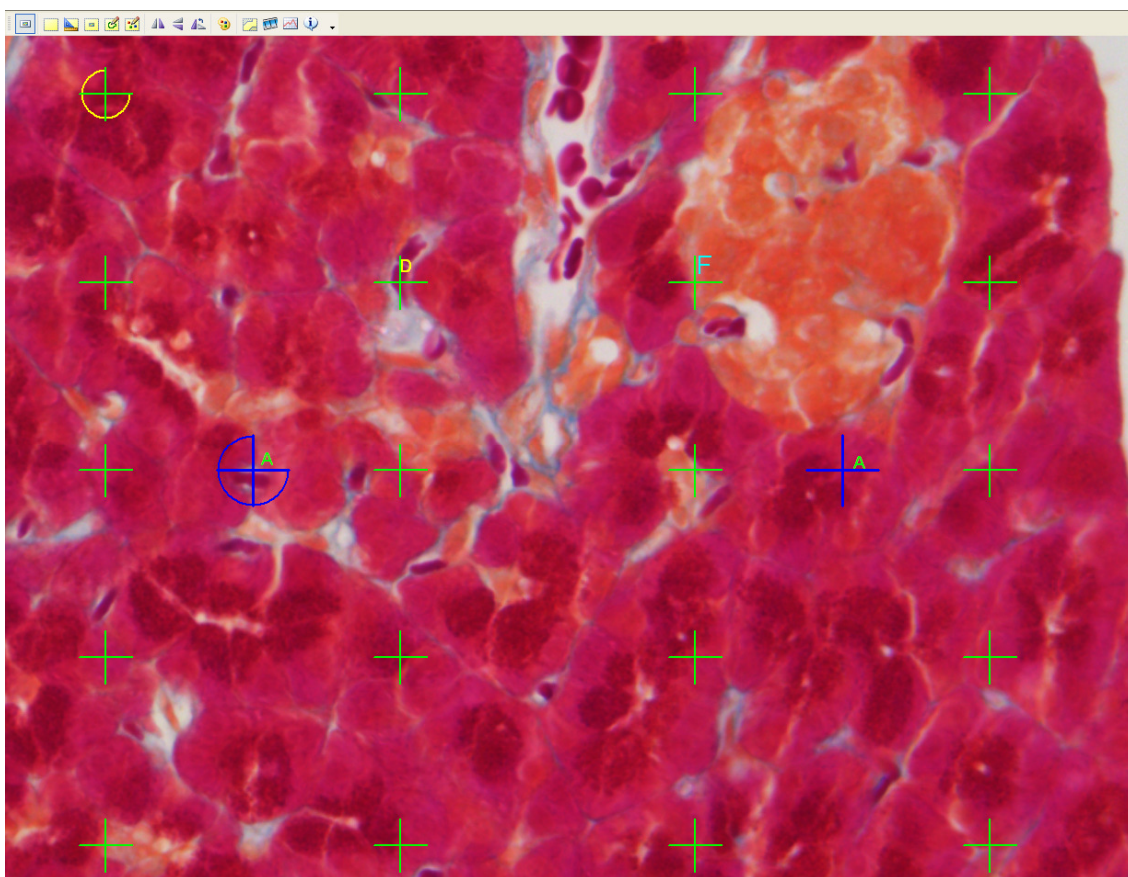
Stereološka ispitivanja

Stereološka ispitivanja na nivou svetlosne mikroskopije

Stereološka ispitivanja egzokrinog pankreasa

Stereološka analiza egzokrinog pankreasa imala je za cilj da se utvrdi procentualno učešće pojedinih komponenti, tj. faza (acinusa, vezivnog tkiva, izvodnih kanala, krvnih sudova i eventualno nerava) u okviru organa i proceni da li se

zastupljenost pojedinih faza razlikuje u zavisnosti od primenjenog eksperimentalnog tretmana. Iz četiri bloka pankreasa po životinji, nasumično izabrana, napravljeni su preseki tkiva i obojeni AZAN-om. Iz središnjeg regiona svakog bloka izabran je po jedan reprezentativni presek na kome je korišćenjem mrežnog sistema prebrojavan broj pogodaka koji su padali na svaku od faza od interesa. Za acinuse, kao najzastupljeniju fazu, bile su dovoljne dve testne tačke (mrežni sistem A 2), dok je za sve ostale faze primenjivana mrežica sa 20 testnih tačaka po vidnom polju (mrežni sistem A 20), pri uveličanju objektiva x40 (Slika 3.1.). Na osnovu prethodno sprovedenog pilot testiranja utvrđeno je da nema statistički značajne razlike kada se obradi 30% ili 100% svakog preseka, tako da je stereološka analiza egzokrinog pankreasa podrazumevala obradu 30% nasumično, ali sistematično odabranih vidnih polja.



Slika 3.1. Izgled reprezentativnog vidnog polja pankreasa kontrolne životinje sa testnim sistemom od dve tačke za procenu zastupljenosti acinusa, odnosno 20 tačaka za sve druge faze od interesa. Orig. uveličanje x40.

Stereološko ispitivanje egzokrinog pankreasa izvedeno je posmatranjem preseka tkiva na Olympus BX51 mikroskopu, opremljenom Olympus U-TV0.5XC-3 kamerom i korišćenjem Visiopharm Integrator System softvera.

Stereološka ispitivanja endokrinog pankreasa

Stereološka analiza Langerhansovih ostrvaca i njegovih insulin-, glukagon-, somatostatin- i pankreasni polipeptid-produkujućih ćelija izvedena je „point counting“ tehnikom, uz korišćenje Weibel-ove mnogonamenske testne mrežice M 42 (Weibel 1979). Weibel-ova testna mrežica postavljena u okular Nikon mikroskopa služila je za određivanje broja testnih tačaka koje padaju na strukture od interesa, na presecima tkiva obojenim odgovarajućom imunohistohemijskom metodom. Za određivanje dijametra ostrvaca korišćena je mikrometerska okularna skala. Sva merenja vršena su na po tri preseka po pankreasu, pri uveličanju objektiva x10 za Langerhansova ostrvca i x40 za pojedinačne ćelije unutar ostrvaca.

Stereološka ispitivanja Langerhansovih ostrvaca

Na osnovu stereoloških i morfometrijskih ispitivanja određene su zapreminska gustina, numerička gustina, apsolutni broj ostrvaca, njihova masa i dijametar.

Zapreminska (volumenska) gustina (V_{vf}) faze od interesa dobija se po formuli $V_{vf} = P_f/P_t$, tj. tako što se broj pogodaka na ispitivanu fazu (P_f) podeli s brojem pogodaka koji su padali na čitav presek pankreasa (P_t). Ova stereološka varijabla pokazuje koliki deo sveukupnog tkiva zauzima proučavana faza, odnosno koliki je procenat ispitivane faze u jedinici volumena.

Numerička gustina (N_v) daje podatak o tome koliko ima određenih čestica u jedinici prostora i izračunata je po metodi DeHoff i Rhines-a, kako je opisano kod Aherne i Dunnill-a (1982a): $N_v = k/\beta \times \sqrt{N_A^3}/V_v$, gde je k/β konstantna vrednost i iznosi 1.485 za sferu, što je oblik većine Langerhansovih ostrvaca. Za ovu formulu, osim volumenske gustine (V_v) potreban je i podatak o broju profila čestica u ravni preseka

(N_A), što se izračunava tako što se broj čestica od interesa, tj. ostrvaca (N), podeli sa testnom površinom, odnosno površinom preseka pankreasa (A_t), $N_A = N/A_t$. Testnu površinu određujemo po formuli $A_t = P_t \times \sqrt{3}/2 \times d^2$, gde je P_t broj pogodaka na preseku, a d je dužina testne linije i zavisi od uveličanja objektiva mikroskopa.

Apsolutni broj ostrvaca (N) dobija se kada se numerička gustina ostrvaca (N_v) pomnoži s apsolutnom zapreminom pankreasa (V), $N = N_v \times V$. Apsolutna zapremina pankreasa izračunata je na osnovu mase pankreasa (W) po formuli: V (ml) = 0.95 x W (g) (Aherne and Dunnill 1982b).

Masa ostrvaca (m) izračunava se množenjem volumenske gustine ostrvaca (V_v) sa masom pankreasa (W), $m = V_v \times W$.

Volumen ostrvaca (V_o) dobija se korišćenjem formule $V_o = \pi/6 \times d^3$, gde je d srednji prečnik ostrvaca. Srednji prečnik ostrvaca predstavljen je aritmetičkom sredinom najmanjeg i najvećeg prečnika, koji su jedan u odnosu na drugi postavljeni pod pravim uglom.

Stereološka ispitivanja pojedinih endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca

Stereološka ispitivanja endokrinih ćelija pankreasa sprovedena su na imunohistohemijski obojenim presecima tkiva. Određivan je broj pojedinih endokrinih ćelija po ostrvcu, volumenska gustina određenog tipa ćelija u okviru ostrvca, površina preseka pojedinačne endokrine ćelije i masa ćelija. Svaka grupacija endokrinih ćelija u kojoj se moglo jasno uočiti četiri ili više ćelija tretirana je kao ostrvce.

Broj pojedinih endokrinih ćelija po ostrvcu dobijen je deljenjem broja određenih ćelija (njihovih jedara) s brojem ostrvaca. Volumenska gustina odgovarajućih endokrinih ćelija određivana je po istoj formuli kao i zapreminska gustina Langerhansovih ostrvaca, tako što se broj pogodaka na konkretne endokrine ćelije delio s brojem pogodaka na ostrvce. Površina profila individualne endokrine ćelije određenog tipa izračunata je tako što je ukupna površina određenih endokrinih ćelija u ostrvcu deljena sa brojem nukleusa tog tipa ćelija. Masa pojedinih tipova endokrinih ćelija

dobijena je množenjem volumenske gustine tog tipa ćelija sa masom Langerhansovih ostrvaca.

Stereološka ispitivanja na nivou elektronske mikroskopije

Sa elektronskih mikrografija β -ćelija određivan je broj granula po jedinici površine, korišćenjem Image J 1.45 softvera. Ovi snimci poslužili su i za procenu odnosa zrelih naspram nezrelih granula u zavisnosti od primenjenog tretmana. Takođe, određivana je i prosečna površina profila elektron-gustog dela granule, na oko 300 granula po grupi. Obradeno je minimum 15 fotografija po grupi, snimanih pod uveličanjem x8800.

Statistička obrada rezultata

Za sve bročane vrednosti rezultata merenja određene su srednje vrednosti i standardne greške.

Dvofaktorskom analizom varijanse (faktori su tretman metimazolom i ishrana saharozom), i to dvofaktorskim MANOVA i dvofaktorskim ANOVA testovima utvrđen je nivo razlika osobina između četiri eksperimentalne grupe. MANOVA test korišćen je kao preliminarni test da bi se za određenu grupu varijabli utvrdilo da li razlike među grupama postoje. U slučaju da je MANOVA testom utvrđeno da razlike na osnovu dva faktora ne postoje, dalje statističke analize nisu rađene. U suprotnom, ako je na osnovu MANOVA testa utvrđeno postojanje razlika za grupu varijabli, detaljnija slika za svaku varijablu ponaosob dobija se dvofaktorskim ANOVA testovima. S obzirom na to da dvofaktorska analiza varijanse daje informaciju samo o tome da li se četiri analizirane grupe razlikuju uzimajući u obzir tretman i ishranu, a bez detalja o odnosima svake grupe sa svakom, urađena je i post-hoc Bonferroni korigovana analiza varijanse za multipla poređenja.

Statistička analiza podataka urađena je pomoću softverskog paketa Statistica 7.

4. REZULTATI

Ekperimentalne životinje i primenjeni tretman

Efekat eksperimentalnih uslova na ishranu životinja i energetske unos

Tokom tronedelnog eksperimenta sve životinje bile su dobrog zdravlja i vitalne. Nadgledanjem unosa tečnosti (kako bi se pratio unos metimazola i saharoze) i hrane mogao se precizno izračunati ukupan dnevni unos energije životinja (Tabela 1). Na prosečni dnevni unos hrane i tečnosti, kao i na ukupan energetske unos uticali su i tretman metimazolom i ishrana obogaćena saharozom (Tabela 2). Životinje svih eksperimentalnih grupa unosile su statistički značajno manje hrane u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabele 1 i 3). Iz Tabele 1 vidi se da su životinje tretirane metimazolom (M i MS grupa) unosile manje tečnosti od kontrolne grupe, premda je statistička značajnost registrovana samo za MS grupu, dok je S grupa pila značajno više od životinja svih drugih grupa (Tabele 1 i 4). Tokom eksperimenta primećeno je da su životinje S grupe više i urinirale.

Tabela 1. Unos hrane, tečnosti i ukupan energetske unos

	K	M	S	MS
Prosek dnevnog unosa hrane (g)	28.4±0.6	22.6±0.6	21.4±1.0	20.6±0.9
Prosek dnevnog unosa tečnosti (ml)	42.4±1.2	33.6±1.6	79.5±3.3	32.8±1.0
Ukupan energetske unos (kJ)	312.0±6.8	248.9±6.2	370.7±12.9	282.3±10.2

Tabela 2. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) unosa hrane, tečnosti i ukupnog energetske unosa. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
Prosek dnevnog unosa hrane (g)	13.930	0.0010	26.223	0.0000	7.912	0.0096
Prosek dnevnog unosa tečnosti (ml)	165.029	0.0000	70.171	0.0000	76.558	0.0000
Ukupan energetske unos (kJ)	53.37	0.0000	19.76	0.0002	1.48	0.2351

Tretman metimazolom uticao je na statistički značajno smanjenje energetskeg unosa, dok je ishrana obogaćena saharozom povećavala prosečni dnevni energetska unos. Udruženo dejstvo metimazola i saharoze približilo je energetska unos nivou kontrolne grupe (Tabele 1 i 5).

Tabela 3. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse unosa hrane za četiri grupe

Prosek dnevnog unosa hrane (g)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0014			
S	0.0000	1.0000		
MS	0.0000	0.6945	1.0000	

Tabela 4. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse unosa tečnosti za četiri grupe

Prosek dnevnog unosa tečnosti (ml)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0734			
S	0.0000	0.0000		
MS	0.0253	1.0000	0.0000	

Tabela 5. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse ukupno unete energije za četiri grupe

Ukupan energetska unos (kJ)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0030			
S	0.0031	0.0000		
MS	0.3265	0.1899	0.0000	

Dejstvo eksperimentalnih uslova na rast životinja, masu i volumen pankreasa

U Tabeli 6 prikazane su srednje vrednosti i standardne greške praćenih osobina u okviru četiri grupe životinja.

Tabela 6. Masa životinja, masa i volumen pankreasa

	K	M	S	MS
Početna telesna masa (g)	217.5±9.6	218.0±7.4	213.6±6.4	214.8±6.7
Završna telesna masa (g)	352.7±9.5	293.0±5.9	363.1±13.8	297.3±8.6
Prirast mase (g)	135.2±1.8	75.0±6.8	149.5±8.0	82.5±4.8
Masa pankreasa (g)	1.11±0.05	0.82±0.02	0.83±0.06	0.86±0.07
Relativna masa pankreasa (g)	0.314±0.015	0.279±0.006	0.230±0.014	0.288±0.021
Volumen pankreasa (ml)	1.05±0.05	0.78±0.02	0.79±0.06	0.82±0.06

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na promenu telesne mase uticaj ima tretman metimazolom (Tabela 7). Naime, u grupama tretiranim metimazolom (M i MS grupe) primećeno je statistički značajno zaostajanje u rastu u odnosu na K i S grupe (Tabele 6 i 8).

Tabela 7. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) prirasta mase životinja, mase i volumena pankreasa. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
Prirast mase (g)	104.73	0.0000	3.09	0.0917	0.30	0.5875
Masa pankreasa (g)	5.16	0.0324	4.02	0.0564	7.30	0.0125
Relativna masa pankreasa (g)	0.55	0.4673	5.52	0.0273	8.46	0.0077
Volumen pankreasa (ml)	5.1446	0.0326	4.0078	0.0567	7.2917	0.0125

Tabela 8. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse prirasta mase životinja za četiri grupe

Prirast mase (g)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0000			
S	0.6953	0.0000		
MS	0.0000	1.0000	0.0000	

Tabela 9. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse mase pankreasa za četiri grupe

Masa pankreasa (g)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0186			
S	0.0169	1.0000		
MS	0.0352	1.0000	1.0000	

Tabela 10. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse relativne mase pankreasa za četiri grupe

Relativna masa pankreasa (g/100 g TM)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.9844			
S	0.0064	0.2338		
MS	1.0000	1.0000	0.0616	

Tabela 11. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse volumena pankreasa za četiri grupe

Volumen pankreasa (ml)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0187			
S	0.0170	1.0000		
MS	0.0355	1.0000	1.0000	

Na razlike među grupama u masi pankreasa tretman metimazolom prevashodno je uticao na apsolutnu masu organa, dok je pre svega ishrana obogaćena saharozom uticala na relativnu masu pankreasa (Tabela 7). Masa pankreasa je pod svim eksperimentalnim uslovima značajno manja u odnosu na masu pankreasa kontrolnih životinja (Tabele 6 i 9). Međutim, relativna masa pankreasa statistički je značajno niža samo kod S grupe životinja u poređenju sa svim drugim grupama (Tabele 6 i 10).

Volumen pankreasa smanjio se kod svih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolu (Tabele 6 i 11).

Uticaj uslova eksperimenta na koncentraciju odabranih biohemijskih parametara u serumu

U Tabeli 12 prikazane su vrednosti praćenih biohemijskih parametara u serumu eksperimentalnih životinja.

Tabela 12. Koncentracije glukoze, insulina, triglicerida i tireoidnih hormona u serumu

	K	M	S	MS
Glukoza (mmol/l)	7.12±0.13	6.67±0.12	7.65±0.17	6.96±0.11
Insulin (mIU/l)	90.72±11.42	68.30±5.17	91.91±6.99	105.31±22.06
Trigliceridi (mmol/l)	1.42±0.12	0.82±0.10	1.46±0.08	0.89±0.13
T3 (nmol/l)	1.23±0.10	0.97±0.06	1.40±0.12	0.96±0.08
T4 (nmol/l)	88.50±3.07	3.42±0.56	94.50±8.63	3.55±1.16

Iako se iz Tabele 12 vidi da postoji tendencija ka povećanju koncentracije insulina u krvi MS grupe životinja, dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala postojanje razlika među grupama (Tabela 13). Na koncentraciju glukoze u serumu uticaj imaju i tretman metimazolom i ishrana obogaćena saharozom, dok su svi ostali biohemijski parametri samo pod uticajem tretmana metimazolom (Tabela 13).

Iako su koncentracije oba hormona štitne žlezde pod uticajem metimazola, njihov odgovor na tretman donekle je različit. Za koncentraciju T3 postoji trend smanjenja kod metimazolom tretiranih životinja (M i MS grupe) u odnosu na K grupu

Tabela 13. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) koncentracije glukoze, insulina, triglicerida i tireoidnih hormona u serumu. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
Glukoza (mmol/l)	16.74	0.0004	8.89	0.0065	0.73	0.4014
Insulin (mIU/l)	0.10	0.7589	1.73	0.2007	1.52	0.2294
Trigliceridi (mmol/l)	28.06	0.0000	0.28	0.6037	0.01	0.9112
T3 (nmol/l)	12.95	0.0014	0.63	0.4365	0.80	0.3787
T4 (nmol/l)	280.69	0.0000	0.34	0.5648	0.31	0.5818

(Tabela 12), ali nema statistički značajne razlike (Tabela 16), dok koncentracija T4 pokazuje veoma veliko i statistički značajno sniženje kod obe grupe metimazolom tretiranih životinja u odnosu na eutireoidne životinje (Tabele 12 i 17).

Tabela 14. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse koncentracije glukoze u serumu za četiri grupe

Glukoza (mmol/l)	K	M	S	MS
K				
M	0.2558			
S	0.0729	0.0002		
MS	1.0000	0.8726	0.0055	

Tabela 15. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse koncentracije triglicerida u serumu za četiri grupe

Trigliceridi (mmol/l)	K	M	S	MS
K				
M	0.0091			
S	1.0000	0.0023		
MS	0.0151	1.0000	0.0035	

Tabela 16. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse koncentracije T3 u serumu za četiri grupe

T3 (nmol/l)	K	M	S	MS
K				
M	0.5197			
S	1.0000	0.0291		
MS	0.3524	1.0000	0.0130	

Tabela 17. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse koncentracije T4 u serumu za četiri grupe

T4 (nmol/l)	K	M	S	MS
K				
M	0.0000			
S	1.0000	0.0000		
MS	0.0000	1.0000	0.0000	

Koncentracija glukoze u serumu veća je kod životinja koje su pile rastvor saharoze, a niža kod metimazolom tretiranih životinja (M i MS grupe) u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 12). Dvofaktorska analiza varijanse pokazuje da su na koncentraciju glukoze u krvi uticaj imali i tretman metimazolom i ishrana obogaćena ugljenim hidratima (Tabela 13). Međutim, statistički značajna razlika ustanovljena je samo između S i obe grupe metimazolom tretiranih životinja (Tabela 14).

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na koncentraciju triglicerida u krvi uticaj ima tretman metimazolom (Tabela 13), i to tako što je u grupama tretiranim metimazolom (M i MS grupe) statistički značajno manje triglicerida u odnosu na K i S grupe životinja (Tabela 12 i 15).

Koeficijent insulina

Pošto su dosadašnje analize pokazale da postoje razlike u ukupnom unosu energije između životinja različitih grupa, a razlike u koncentraciji insulina uslovljene eksperimentalnim uslovima nisu zabeležene, želeli smo da ispitamo međusobni odnos

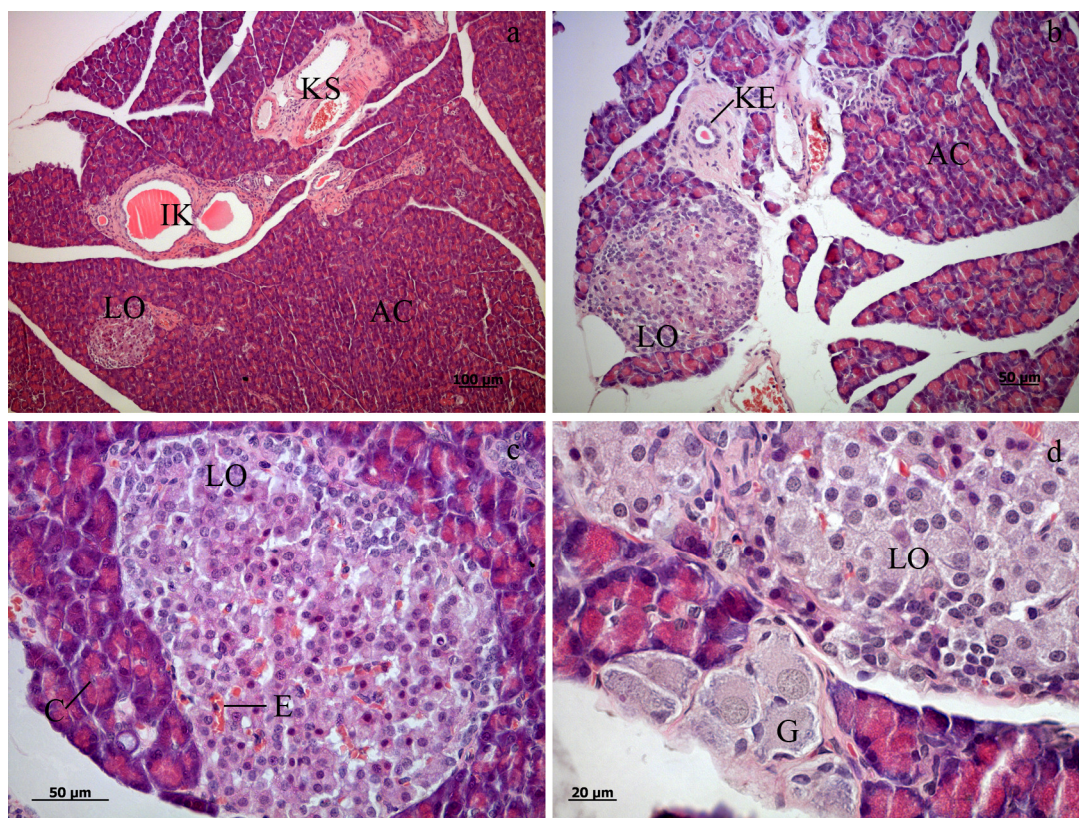
koncentracije insulina u zavisnosti od jedinično unete energije. „Insulinski koeficijent“ predstavlja količinu insulina u cirkulaciji koja je sekretovana kao odgovor na 1kJ unete energije (Tabela 18). Dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala postojanje razlika u insulinskom koeficijentu različitih grupa, odnosno koncentracija insulina uvek je bila proporcionalna ukupnom energetsom unosu.

Tabela 18. Koncentracija insulina po jedinici unete energije

	K	M	S	MS
Koncentracija insulina (mIU/l)/kJ	0.29±0.03	0.27±0.02	0.25±0.02	0.37±0.07

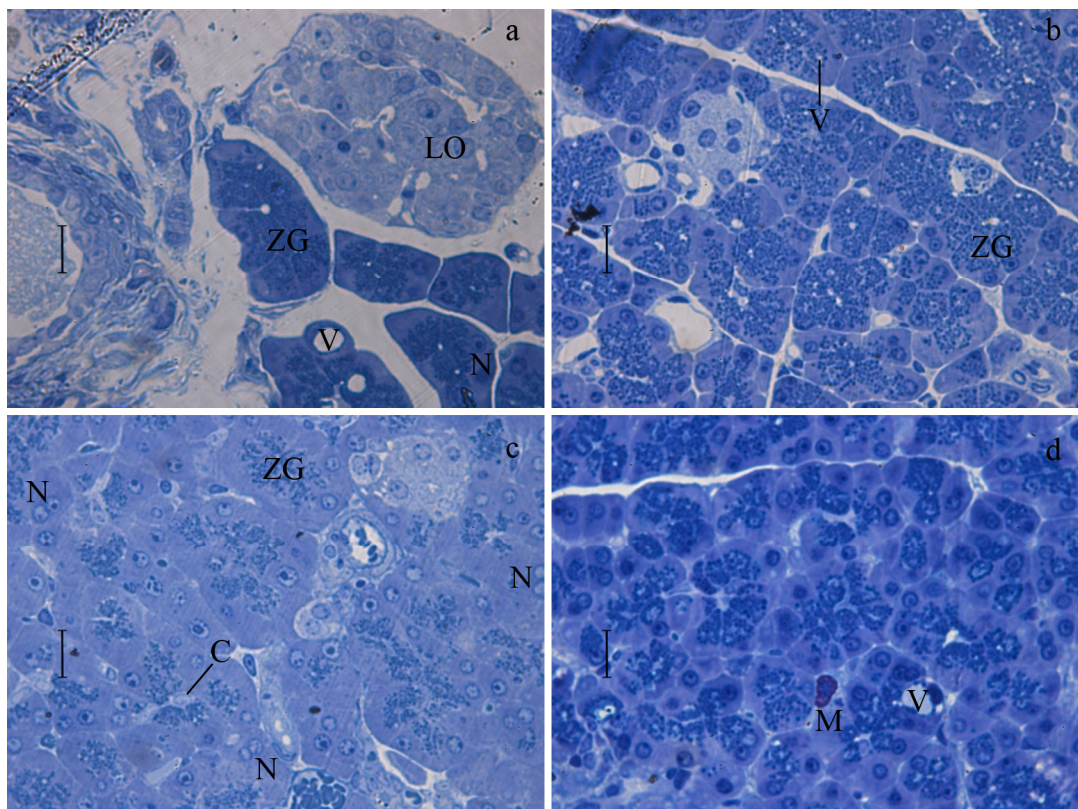
Opšti plan građe organa

Preseci pankreasa debljine 5 µm obojeni klasičnom hematoksilin i eozin (H&E) metodom pružili su uvid u opšti plan građe organa životinja kontrolne grupe. Pankreas se najvećim delom sastoji od acinusa egzokrinog pankreasa i njegovih izvodnih kanala. Veći krvni sudovi pružaju se duž vezivno-tkivnih septi koje se nalaze između pankreasnih lobulusa (Slika 4.1.a). Manji, svetlije obojeni, okruglasti profil je Langerhansovo ostrvce, endokrina komponenta pankreasa. Pod većim uvećanjima objektiva uočavamo detaljniju građu pojedinih delova pankreasa. Lumen izvodnih kanala egzokrinog pankreasa (Slika 4.1.b) ovičava jednoslojni kockasti epitel. Ovi intralobularni kanali u kontinuitetu su sa interkalarnim kanalima koji se pružaju od središnjeg regiona acinusa. Pločaste epitelske ćelije početnog dela interkalarnog kanala identifikujemo na tkivnim presecima kao centroacinusne ćelije (Slika 4.1.c). Na istom snimku u okviru Langerhansovog ostrvca uočava se mnoštvo eritrocita, što svedoči o jako dobro razvijenoj mreži kapilara. Ponekad se na presecima pankreasa vide ganglije, odnosno klasteri ćelijskih tela neurona van centralnog nervnog sistema (Slika 4.1.d). Ćelijska tela ovih postsinaptičkih neurona izuzetno su krupna, poseduju okrugao i svetao, euhromatski nukleus, a okružena su sitnim, spljoštenim, tamnije obojenim satelitskim ćelijama. Na osnovu posmatranja hematoksilinom i eozinom obojenih preparata nisu uočene bitne razlike u histološkoj građi organa između kontrolne i eksperimentalnih grupa.



Slika 4.1. Opšti izgled pankreasa pacova. Bojenje hematoksilinom i eozinom. AC-acinusi, IK-izvodni kanali, KS-krvni sudovi, LO-Langerhansova ostrvca, KE-kockasti epitel, C-centroacinusna ćelija, E-eritrociti u lumenu kapilara, G-ganglija. (a x10; b x20; c x40; d x63)

Dodatni podaci o opštem planu građe pankreasa dobijeni su i na osnovu posmatranja tkivnih preseka obojenih AZAN metodom, koji su služili za stereološka ispitivanja. Detaljnom analizom većeg broja preseka pankreasa eksperimentalnih životinja uočeni su određeni detalji u histološkoj građi koji nisu mogli biti zapaženi na rutinski obojenim presecima pankreasa. Diskretne promene primećene su kod životinja koje su unosile saharozu. U S i MS grupi između acinusa bilo je prisutno nešto više vezivnog, pa čak i masnog tkiva koje se po pravilu nalazilo u blizini izvodnih kanala i krvnih sudova. Takođe su i profili vaskularne mreže ispunjeni eritrocitima bili očigledniji u ovim grupama. Pored toga, acinusi su često bili disocirani, naročito u MS grupi, što je davalo „rastresit“ izgled čitavom organu.



Slika 4.2. Histološka građa pankreasa pacova. Polutanki preseci, obojeni toluidin plavim. LO-Langerhansovo ostrvce, N-nukleusi acinusnih ćelija, ZG-zimogene granule, V-vakuole, C-centroacinusna ćelija, M-mastocit. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa, x63)

Polutanki preseci (debljine 1 μm) obojeni toluidin plavim daju jasniju sliku histološke organizacije pankreasa (zbog tanjih preseka u odnosu na H&E obojene preseke) i pružaju bolji uvid u unutarćelijski aranžman organela. Jasno je uočljivo da eozinofilija unutrašnjosti acinusa na H&E obojenim preparatima potiče od brojnih granula koje se nalaze u apikalnim regionima acinusnih ćelija (Slika 4.2.). Zimogene granule mogu zauzimati veći (M grupa, Slika 4.2.b) ili manji deo (S grupa, Slika 4.2.c) apikalne citoplazme, u zavisnosti od konkretnih eksperimentalnih uslova. Acinusne ćelije u svom bazalnom regionu po pravilu imaju jedan nukleus, međutim brojne dvojedarne ćelije prisutne su u S grupi (Slika 4.2.c). Između zimogenih granula acinusnih ćelija primećena je vakuolizacija u manjoj ili većoj meri kod svih eksperimentalnih grupa. Najviše vakuola srednje veličine prisutno je u M grupi životinja

(Slika 4.2.b), a izrazito krupne registrovane su u K i MS grupi (Slike 4.2.a i d). Na presecima pankreasa obojenim toluidin plavim mnogo se lakše uočavaju i centroacinusne ćelije (Slika 4.2.c), kao i mastociti. Mastociti su ćelije promenljivog, nepravilnog oblika, ispunjene brojnim granulama koje se toluidin plavim boje metahromatski. Ove ćelije nalaze se u vezivno-tkivnim septama između acinusa S i MS grupe (Slika 4.2.d) ili ređe u vezivu oko krvnih sudova.

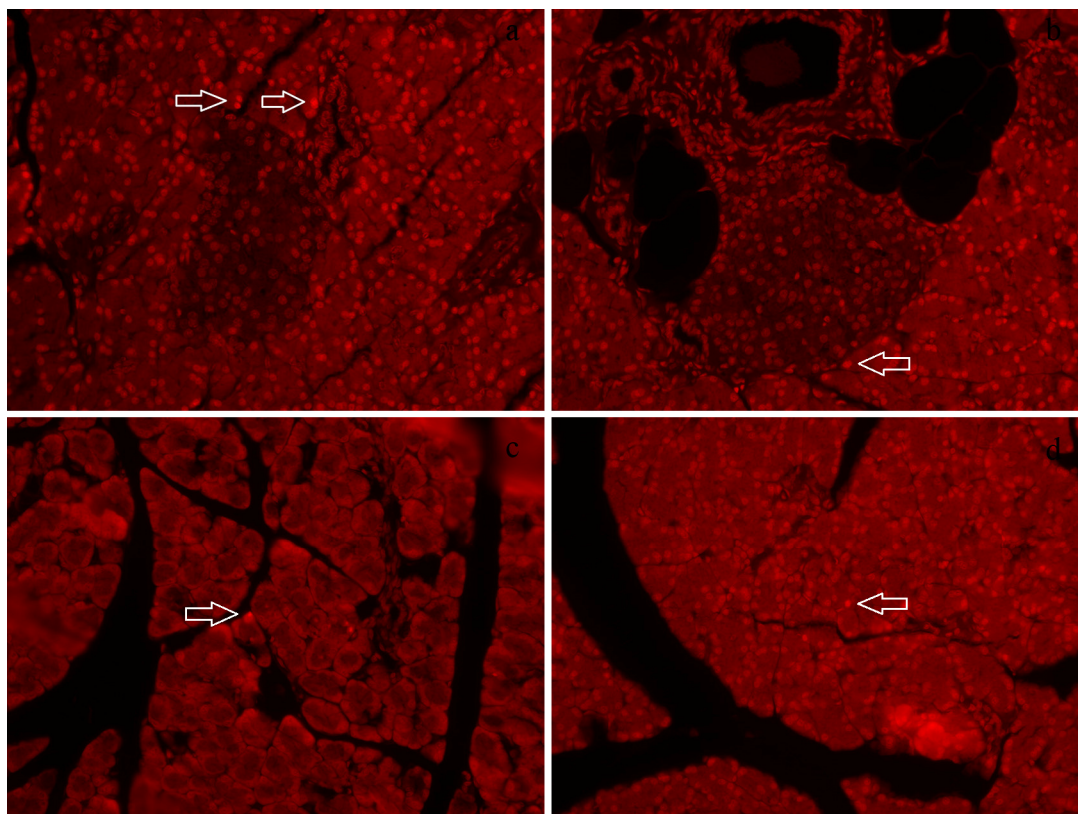
Na rutinski (hematoksilin & eozin i toluidin plavo) i AZAN-om obojenim presecima pankreasa nije primećena razlika u izgledu i građi Langerhansovih ostrvaca između grupa. Stoga su za identifikaciju efekta eksperimentalnih uslova na histološki plan građe naročito endokrinog, ali i egzokrinog pankreasa korišćene specifične i imunohistohemijske metode bojenja za proučavanje pod svetlosnim mikroskopom, klasična elektronska mikroskopija, kao i određene stereološke metode.

Egzokrini pankreas

Histološka analiza egzokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije

Specifično pokazivanje apoptotskih promena

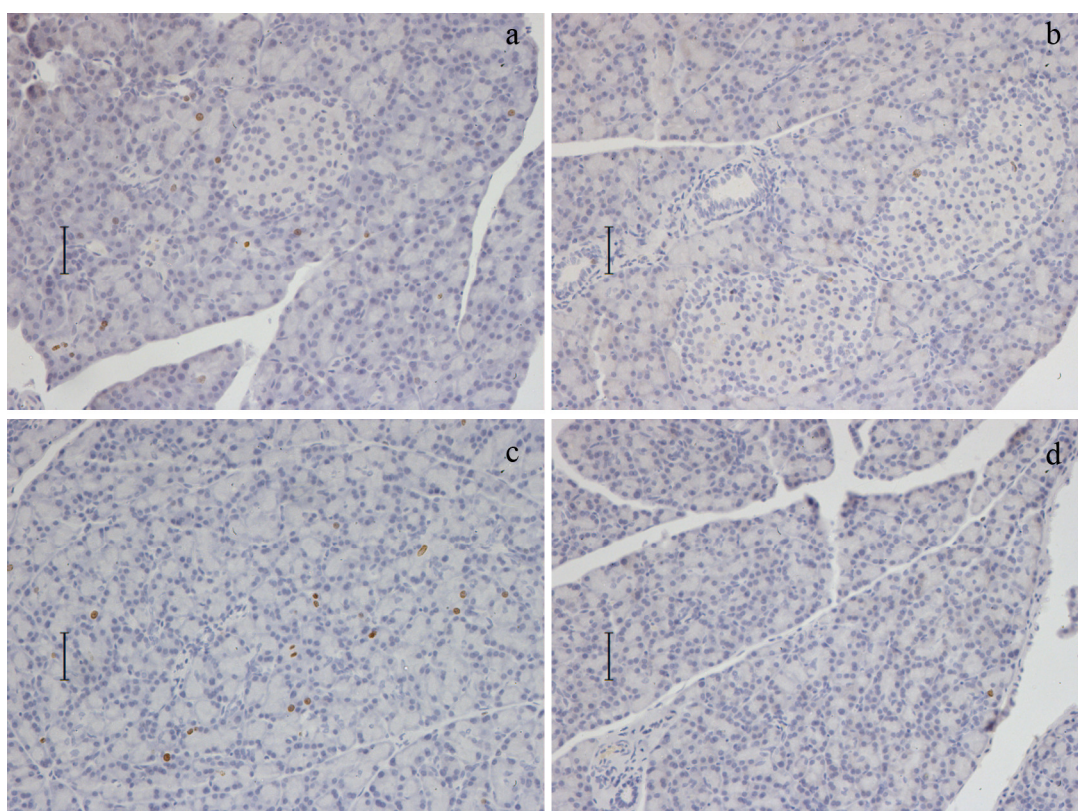
Bojenje propidijum jodidom nije ukazalo na postojanje bitnih razlika u zastupljenosti apoptotskih ćelija u egzokrinom pankreasu. Pojedinačni, homogeno crveno obojeni nukleusi sporadično su prisutni u acinusnim ćelijama svih grupa (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Bojenje propidijum jodidom otkriva retke apoptotske ćelije (strelice) u pankreasu svih grupa životinja. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20)

Imunohistohemijska lokalizacija Ki67

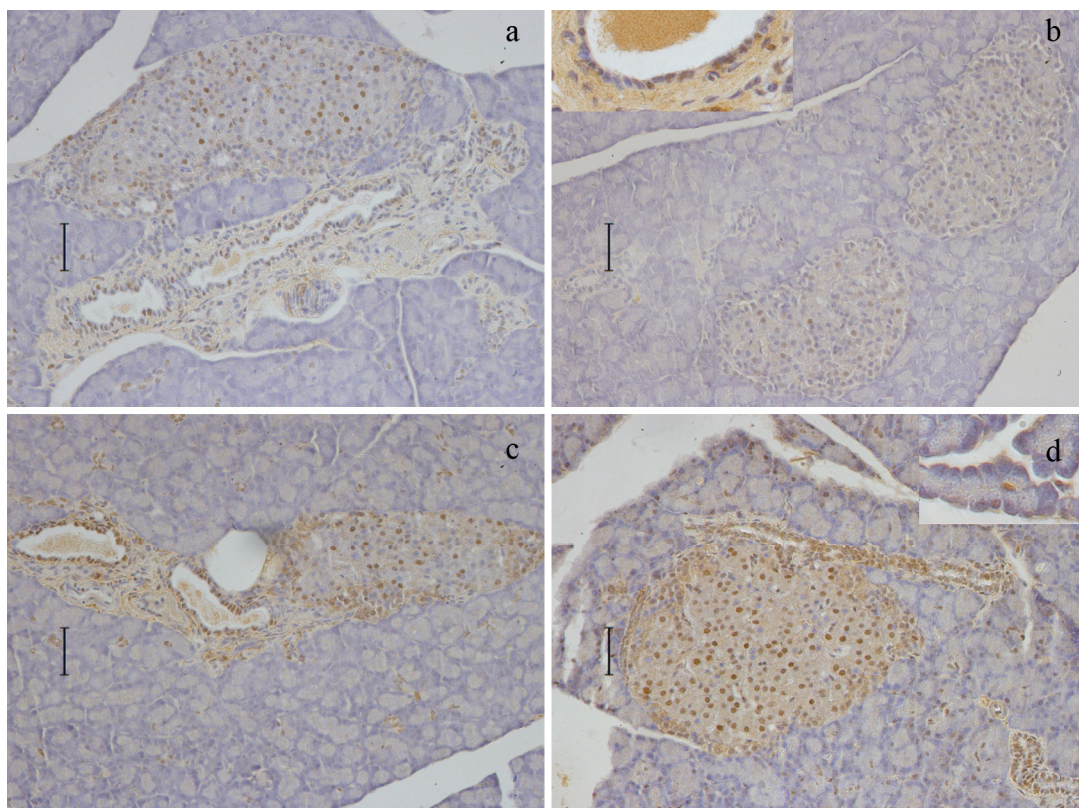
U egzokrinom delu pankreasa kontrolnih životinja ćelije u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa prisutne su u relativno malom broju. Nukleusi pozitivni na Ki67 demonstrirani su u acinusnim ćelijama i ređe u epitelnim ćelijama izvodnih kanala (Slika 4.4.a). Prilikom tretmana metimazolom (M i MS grupe) pozitivnost gotovo u potpunosti odsustvuje (Slika 4.4.b i d), dok ishrana obogaćena saharozom povećava broj Ki67-pozitivnih nukleusa acinusnih ćelija (Slika 4.4.c).



Slika 4.4. Nukleusi imunopozitivni na Ki67 odlika su ćelija u deobi. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20)

Imunohistohemijska lokalizacija PDX1

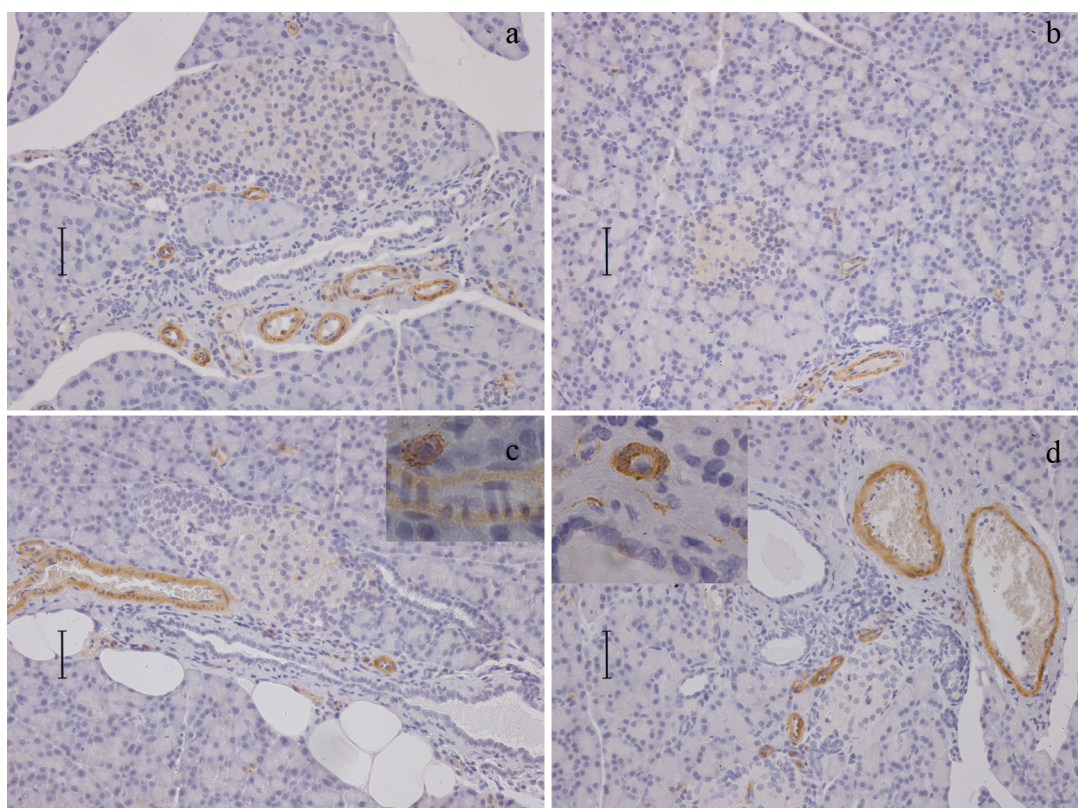
Nukleusni protein PDX1 neophodan je za ispoljavanje potpunog, funkcionalnog fenotipa β -ćelija, ali služi i kao marker za identifikaciju ćelija koje imaju potencijal da se diferenciraju u β -ćelije. Ćelije egzokrinog pankreasa koje u nukleusima eksprimiraju PDX1 lokalizovne su imunohistohemijski, i to su centroacinusne ćelije (Slika 4.5.d, insert) i epitelne ćelije izvodnih kanala (Slika 4.5.b, insert). Kod kontrolnih životinja reakcija je umereno jakog intenziteta (Slika 4.5.a). Slabija reakcija i manji broj pozitivnih ćelija prisutno je u M grupi, pozitivni su nukleusi epitelnih ćelija izvodnih kanala, uglavnom većeg dijametra (Slika 4.5.b). U obe grupe koje su ishranom unosile saharozu (S i MS grupe) prisutno je više, snažnije imunopozitivnih nukleusa (Slika 4.5.c i d).



Slika 4.5. Nukleusi ćelija egzokrinog pankreasa pozitivni na transkripcioni faktor PDX1 ukazuju na potencijal tih ćelija da se transformišu u β -ćelije. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20, inserti x40)

Imunohistohemijska lokalizacija α -SMA

Stelatne ćelije pankreasa jedan su od nekoliko rezidentnih tipova ćelija egzokrinog pankreasa. Nalaze se u neposrednoj blizini acinusa i svojim dugačkim procesusima okružuju njihove bazolateralne domene. Takođe se mogu naći u perivaskularnom i periduktalnom regionu pankreasa. Posle transformacije iz mirujućeg u aktivirano stanje ove miofibroblastima-slične ćelije sintezom komponenti vanćelijskog matriksa doprinose nastanku fibroze u oboljenjima poput hroničnog pankreatitisa i kancera pankreasa. Aktivirane stelatne ćelije eksprimiraju α -SMA (α -smooth muscle actin), aktin koji se uobičajeno sreće u glatkim mišićnim ćelijama.



Slika 4.6. Aktivirane stelatne ćelije nisu detektovane u parenhimu pankreasa. α -SMA pozitivnost zapaža se uglavnom samo u zidu većih krvnih sudova kod svih grupa. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20, inserti x63)

Imunohistohemijska lokalizacija α -SMA ukazuje na njegovu zastupljenost u citoplazmi glatkih mišićnih ćelija u okviru zida krvnih sudova (*tunica media*), kod svih grupa životinja (Slika 4.6.). Samo je u pojedinačnim slučajevima uočeno prisustvo

fibroblastima-sličnih ćelija u vezivnom tkivu uz krvne sudove i izvodne kanale i to u S i MS grupama (inserti na Slici 4.6.c i d).

Analiza egzokrinog pankreasa na nivou elektronske mikroskopije

Ultrastrukturalna analiza egzokrinog pankreasa upotpunila je i razjasnila sliku dobijenu na osnovu posmatranja svetlosno-mikroskopskih preparata.

Acinusne ćelije egzokrinog pankreasa piramidalnog su oblika. U bazalnom, širem delu ćelije smešten je nukleus i granulirani endoplazminski retikulum (gER), dok je uži, vršni deo citoplazme ispunjen tamnim zimogenim granulama (Slika 4.7.a). Pored ovih najčešće uočljivih organela, na presecima pankreasa sporadično se mogu videti i sakule Goldži kompleksa, mitohondrije i komponente endozomsko-lizozomskog sistema.

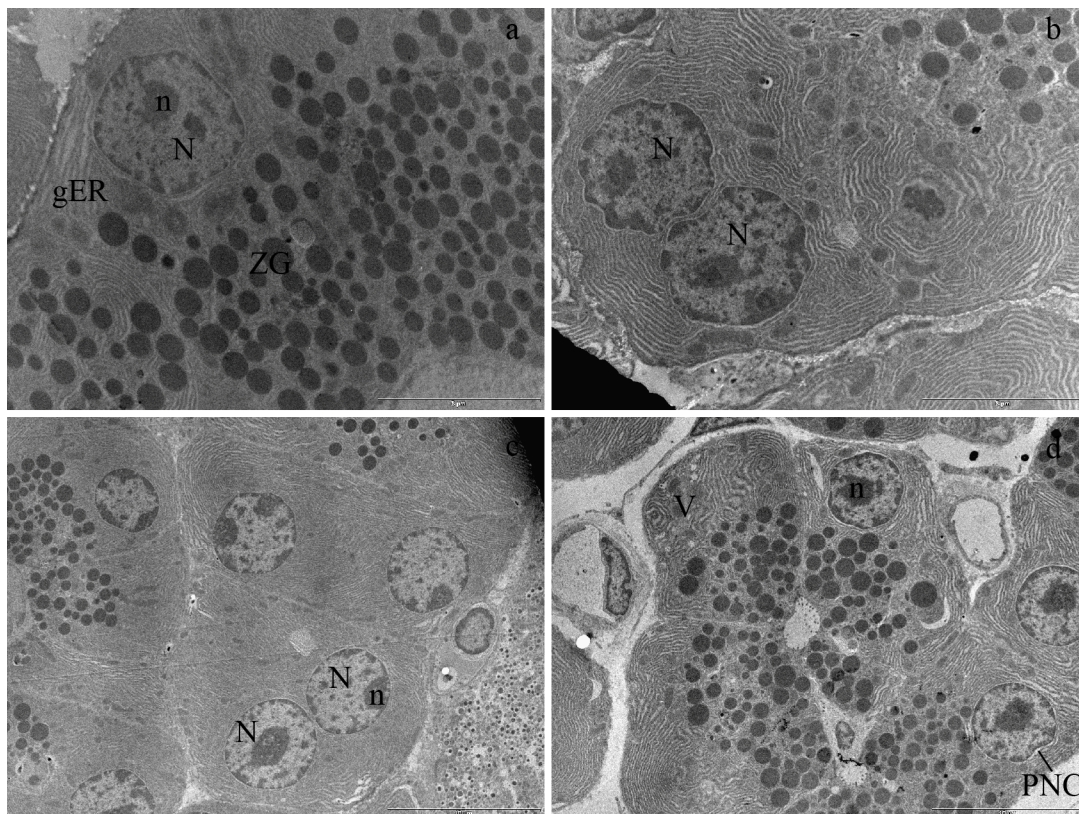
Nukleusi acinusnih ćelija

Acinusne ćelije životinja iz kontrolne grupe po pravilu su jednojedarne, nukleus je okruglog do blago talasastog oblika, sa heterohromatinom smeštenim uz unutrašnju membranu nukleusnog ovoja i sa uočljivim nukleolusom (Slika 4.7.a).

Nukleusi acinusnih ćelija M grupe uglavnom su naglašeno talasasto-okruglog oblika, veća količina heterohromatina naleže na unutrašnju nukleusnu membranu, zbog čega se lakše uočavaju nukleusne pore. Kada je uočljiv, nukleolus je prilično krupan. Primećeno je prisustvo i dvojedarnih acinusnih ćelija, i tada se nukleusi obično „uklapaju“ po obliku kao delovi slagalice (Slika 4.7.b).

Najviše dvojedarnih acinusnih ćelija registrovano je u grupi životinja koje su imale saharozom obogaćenu ishranu. Njihovi nukleusi najčešće su pravilno sferični, euhromatski, a retikularan nukleolus mahom je postavljen uz nukleusni ovoj. Perinukleusna cisterna uglavnom je dobro uočljiva i ujednačene širine (Slika 4.7.c).

Nukleusi acinusnih ćelija životinja koje su bile pod istovremenim uticajem metimazola i saharoze po obliku su okruglasti do blago talasasti. I u ovoj grupi prisutne su u znatnom broju dvojedarne ćelije kod kojih se naročito lepo ističu retikularan nukleolus i nešto proširenija perinukleusna cisterna (Slika 4.7.d).

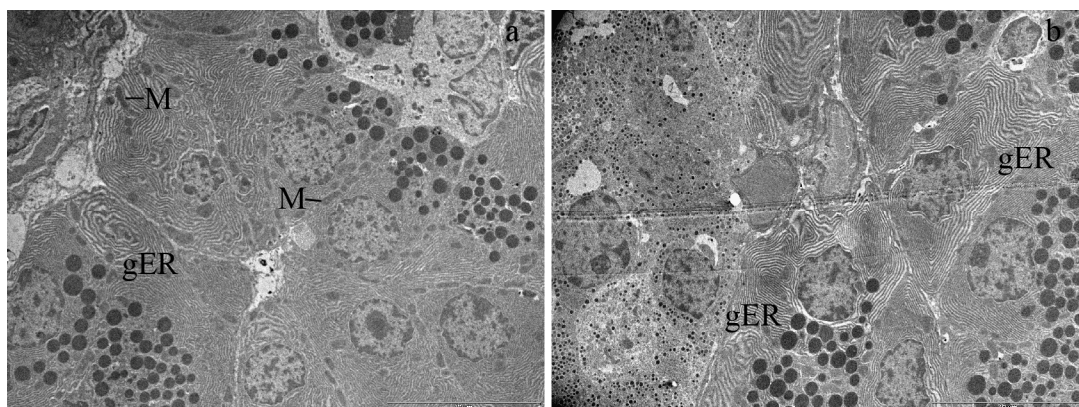


Slika 4.7. Izgled i broj nukleusa acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa. N-nukleus, n-nukleolus, ZG-zimogene granule, gER-granulisani endoplazmin retikulum, PNC-perinukleusna cisterna, V-vakuolizacija gER-a. (a-K grupa, x5600; b-M grupa, x5600; c-S grupa, x2650; d-MS grupa, x2650)

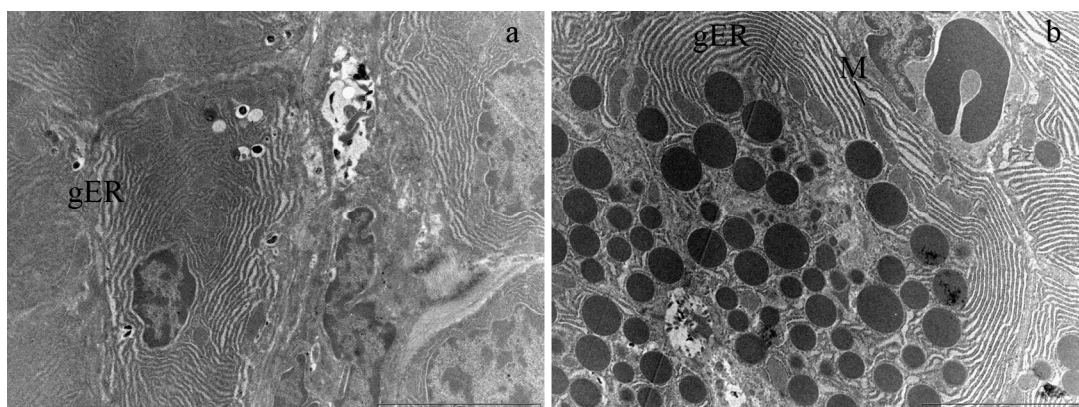
Sintetski aparat u acinusnim ćelijama

Od organela uključenih u sintetske procese u acinusnim ćelijama pankreasa najuočljiviji je granulisani endoplazmin retikulum. U kontrolnim životinjama ova organela ima uobičajen izgled, sastoji se od niza paralelno postavljenih membranskih cisterni za koje su prikačeni ribozomi. Kod obe grupe koje su tretirane metimazolom (M i MS grupe) ponegde su vidljive koncentrično uređene cisterne gER-a (Slika 4.8.). Iako

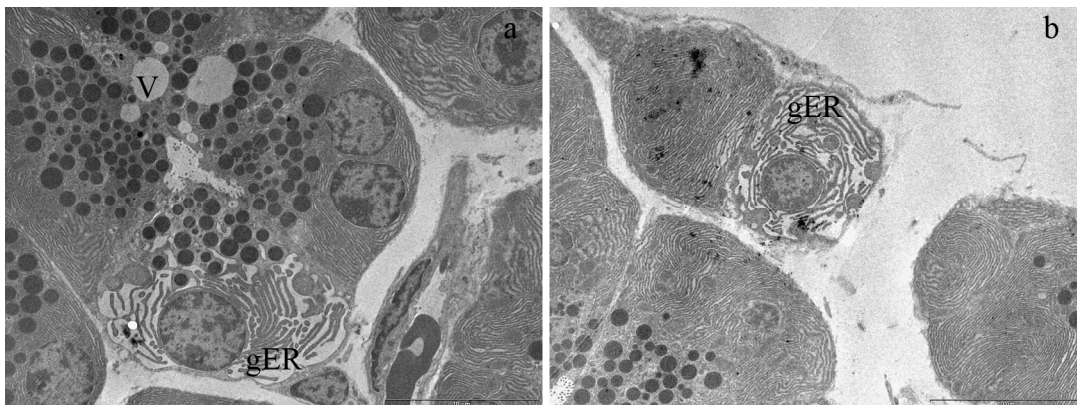
se dilatirane cisterne gER-a pojedinačno sreću u citoplazmi svih grupa životinja, češće prisutna dilatirana cisterna gER-a zajednička je odlika obe grupe koje su imale ishranu obogaćenu saharozom (S i MS grupe). Dilatirane cisterne mogu imati normalan, fiziološko-funkcionalan izgled (Slika 4.9.), ali naglašenija dilatiranost može ukazivati i na patološke procese u ćeliji (Slika 4.10.a i b).



Slika 4.8. Koncentrično uređene cisterne gER-a. M-mitohondrije. (a-M grupa; b-MS grupa; x2650)



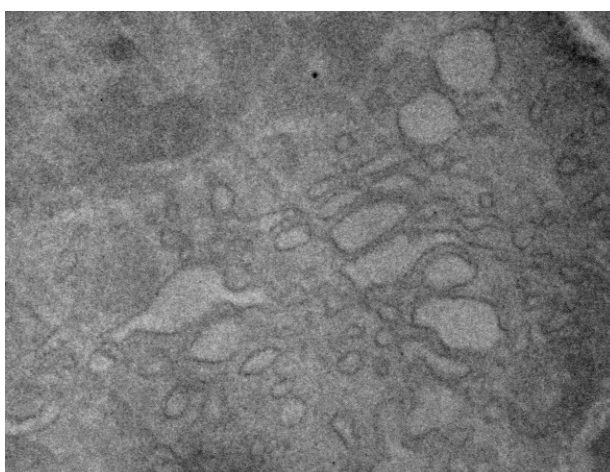
Slika 4.9. Dilatirane cisterne gER-a. M-mitohondrije. (a-S grupa; b-MS grupa; x5600)



Slika 4.10. Patološke promene gER-a. V-vakuola. (a i b-MS grupa; x2650)

Mitochondrije su najlakše uočljive u bazalnom delu ćelija (Slike 4.8.a i 4.9.b), gde se umeću između cisterni gER-a. Uglavnom su izduženog oblika, matriks je tamniji od citoplazme dok su kriste teško uočljive.

Sakule Goldži kompleksa (GK) retko su vidljive na snimcima sa EM. GK sa dobro razvijenom trans-mrežom uočen je samo na presecima pankreasa iz metimazolom tretiranih životinja (Slika 4.11.).

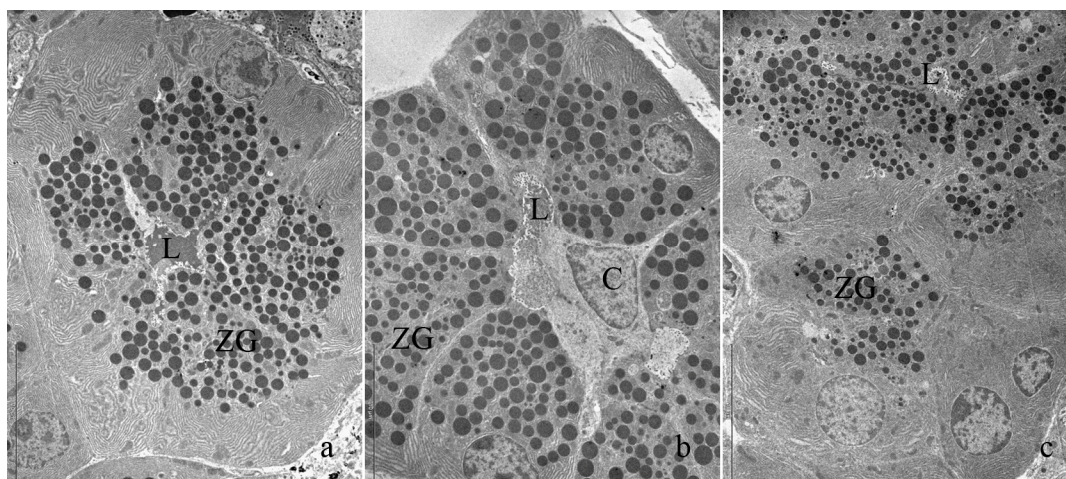


Slika 4.11. Perinukleusno postavljen Goldži kompleks. (M grupa; x8800)

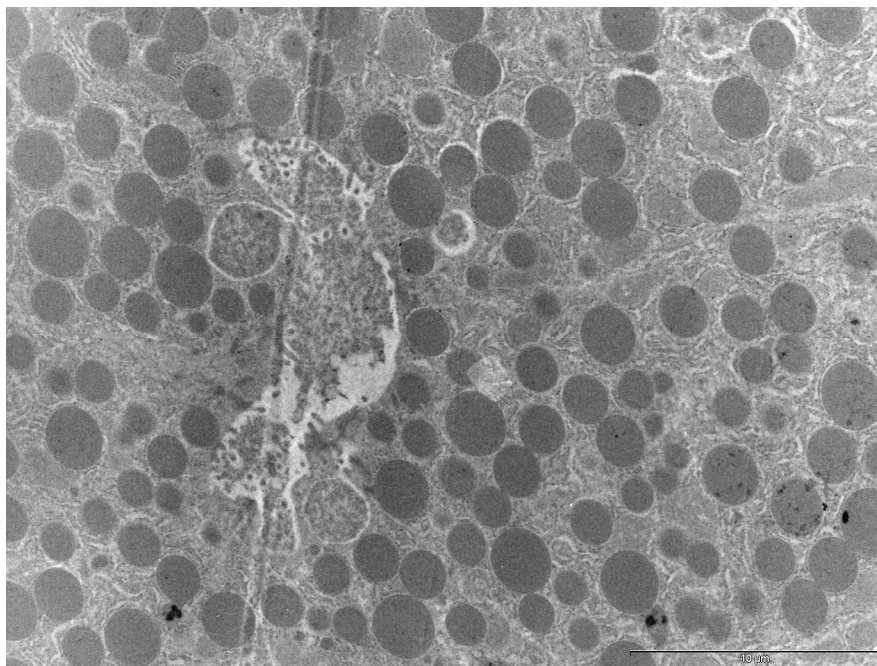
Zimogene granule

Granule u kojima su smešteni proenzimi, tj. još neaktivni digestivni enzimi označavaju se kao zimogene granule. Kod svih grupa životinja zauzimaju apikalnu polovinu acinusnih ćelija. U citoplazmi kontrolnih životinja granule su manje-više ujednačene po veličini, i obično ih nema samo u donjoj trećini ćelija, gde je smešten gER (Slika 4.7.a). Kod metimazolom tretiranih životinja (M i MS grupe) granule su po veličini heterogenije (Slika 4.12.a i b). U S grupi deluje da ima manje zimogenih granula koje su takođe heterogene po veličini, ali preovlađuju sitnije granule (Slika 4.12.c).

Egzocitoza zimogenih granula uočena je kod kontrolne i MS grupe (Slika 4.13.), premda je u lumenu acinusa svih eksperimentalnih grupa vidljiv sekretovan sadržaj (Slika 4.12.).



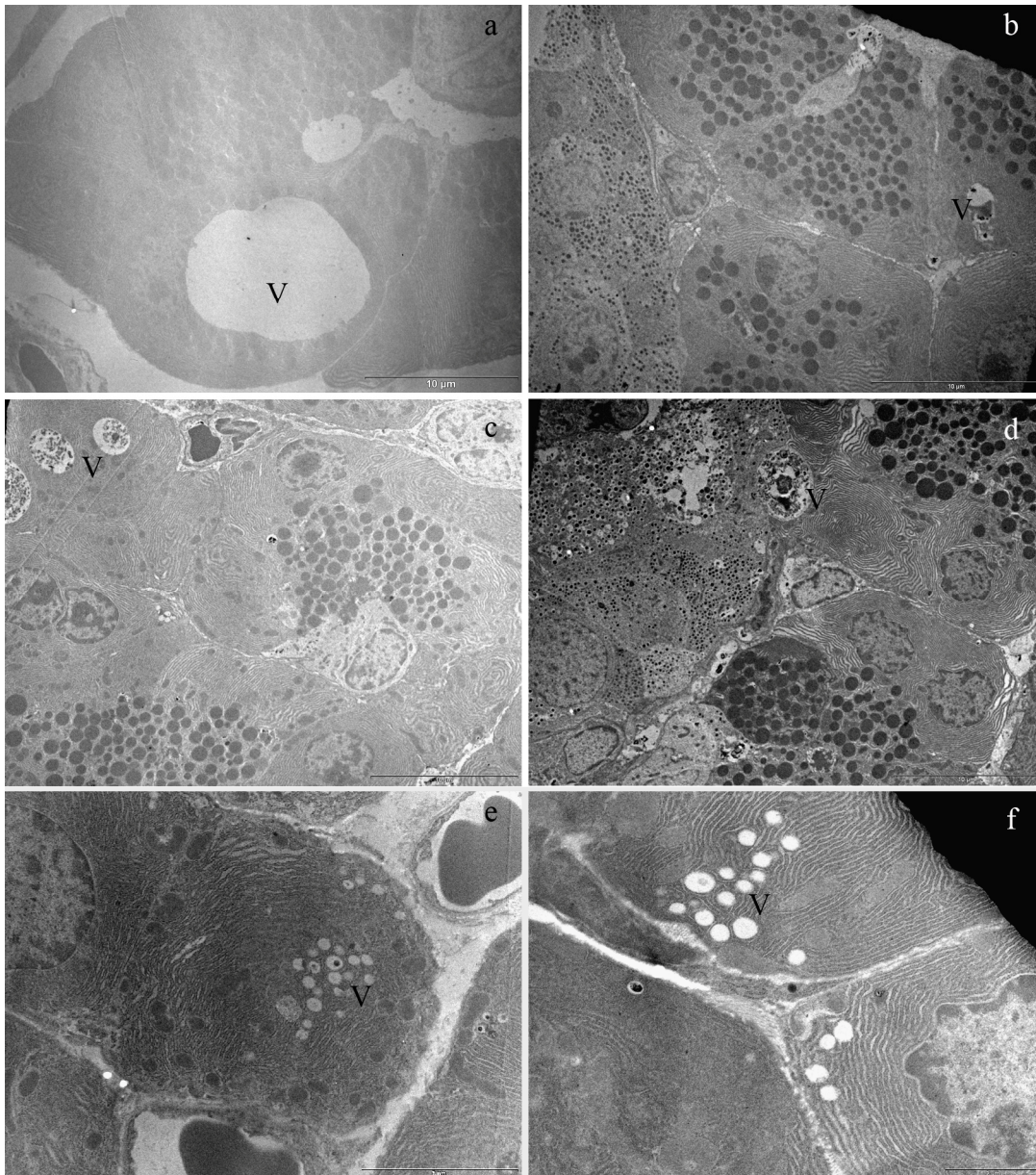
Slika 4.12. Izgled i brojnost zimogenih granula acinusnih ćelija egzokrinog pankreasa. Na slikama se uočava i sekretovan sadržaj zimogenih granula u lumenu acinusa. ZG- zimogene granule, L-lumen acinusa, C-centroacinusna ćelija. (a-M grupa; b-MS grupa; c-S grupa; x2650)



Slika 4.13. Egzocitoza zimogenih granula na apikalnom polu acinusnih ćelija. (MS grupa; x5600)

Vakuolizacija u acinusnim ćelijama

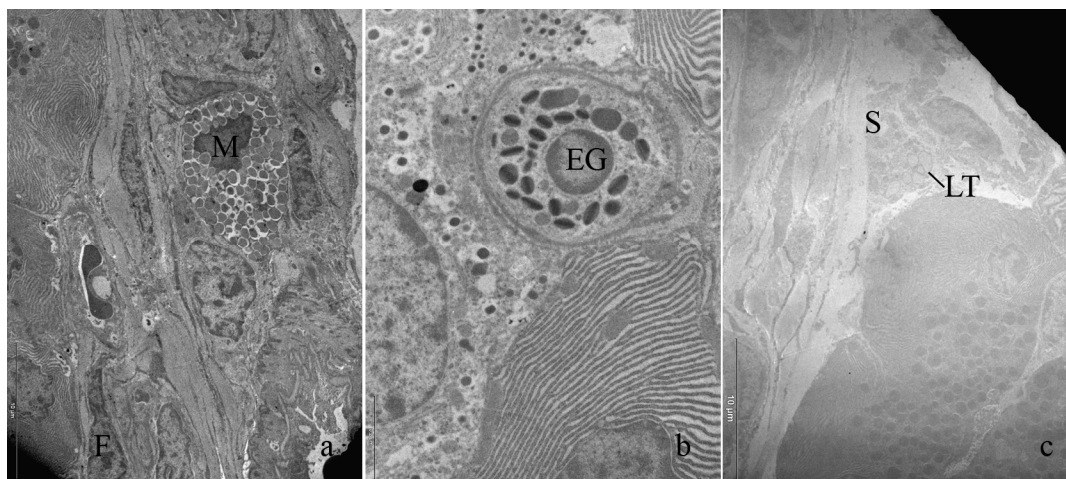
Kod kontrolnih životinja vakuole se u acinusnim ćelijama sreću veoma retko, i uglavnom su velikih dimenzija i svetle, sa ili bez uočljivog sadržaja (Slika 4.14.a i b). U metimazolom tretiranoj grupi životinja češće se zapažaju prilično velike autofagne vakuole ispunjene amorfnim sadržajem (Slika 4.14.c i d), dok u saharoznoj grupi dominiraju sitnije vakuole, bilo sa vidljivim materijalom u unutrašnjosti ili ne (Slika 4.14.e i f). Vakuole najheterogenije po veličini zastupljene su u acinusnim ćelijama hipotireoidne grupe koja je unosila rastvor saharoze. Naime, u ovoj grupi sitnije vakuole obično su pozicionirane u donjem delu ćelije, uz gER (Slika 4.7.d), dok su vakuole srednjih i većih dijametara smeštene u apikalnom regionu ćelije (Slika 4.10.a).



Slika 4.14. Vakuole (V) u acinusnim ćelijama. (a-K grupa, x2650; b-K grupa, x3400; c i d-M grupa, x2650; e-S grupa, x5600; f-S grupa, x8800)

Druge ćelije egzokrinog pankreasa

Pored acinusnih ćelija, ćelija izvodnih kanala i krvnih sudova, uz fibroblaste vezivnog tkiva egzokrinog pankreasa sreću se i drugi tipovi ćelija. U K i S grupi uočeni su mastociti, ispunjeni krupnim tamnim granulama (Slika 4.15.a), a u MS grupi eozinofilni granulocit, prepoznatljiv po svojim specifičnim granulama sa tamnim, centralno postavljenim kristaloidom (Slika 4.15.b). Međutim, najzanimljiviji nalaz je svakako detekcija stelatnih ćelija pankreasa u kontrolnoj grupi. Ove ćelije nalaze se u neposrednoj blizini acinusa, i u mirujućem stanju odlikuje ih zvezdast oblik i prisustvo lipidnih tela u citoplazmi (Slika 4.15.c).



Slika 4.15. Ćelije prisutne u egzokrinom pankreasu: fibroblast (F), mastocit (M), eozinofilni granulocit (EG) i stelatna ćelija (S) sa lipidnim telima (LT). (a-S grupa, x2650; b-MS grupa, x8800; c-K grupa, x2650)

Stereološka analiza egzokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije

Rezultati stereološke analize prikazani su u Tabeli 19. Najveći deo jedinične zapremine pankreasa zauzimaju acinusi, mnogo je manja volumenska gustina vezivnog tkiva, dok se krvni sudovi, izvodni kanali i komponente nervnog sistema sreću u veoma malom procentu. Preliminarni MANOVA test nije pokazao postojanje razlika između grupa pod uticajem ishrane saharozom i tretmana metimazolom za analizirane faze (Tabela 20), pa dalje analize nisu rađene.

Tabela 19. Volumenske gubine (mm⁰) acinusa, veziva, izvodnih kanala, krvnih sudova i nerava

	K	M	S	MS
Acinusi	0.8224±0.0337	0.8913±0.0302	0.8770±0.0129	0.8400±0.0152
Vezivo	0.0534±0.0050	0.0565±0.0078	0.0565±0.0048	0.0555±0.0045
Izvodni kanali	0.0081±0.0019	0.0107±0.0037	0.0088±0.0012	0.0120±0.0015
Krvni sudovi	0.0343±0.0032	0.0306±0.0032	0.0387±0.0028	0.0336±0.0022
Nervi	0.0006±0.0002	0.0006±0.0003	0.0003±0.0002	0.0005±0.0002

Tabela 20. Multivarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori metimazol i saharoza) pet ispitivanih faza. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost.

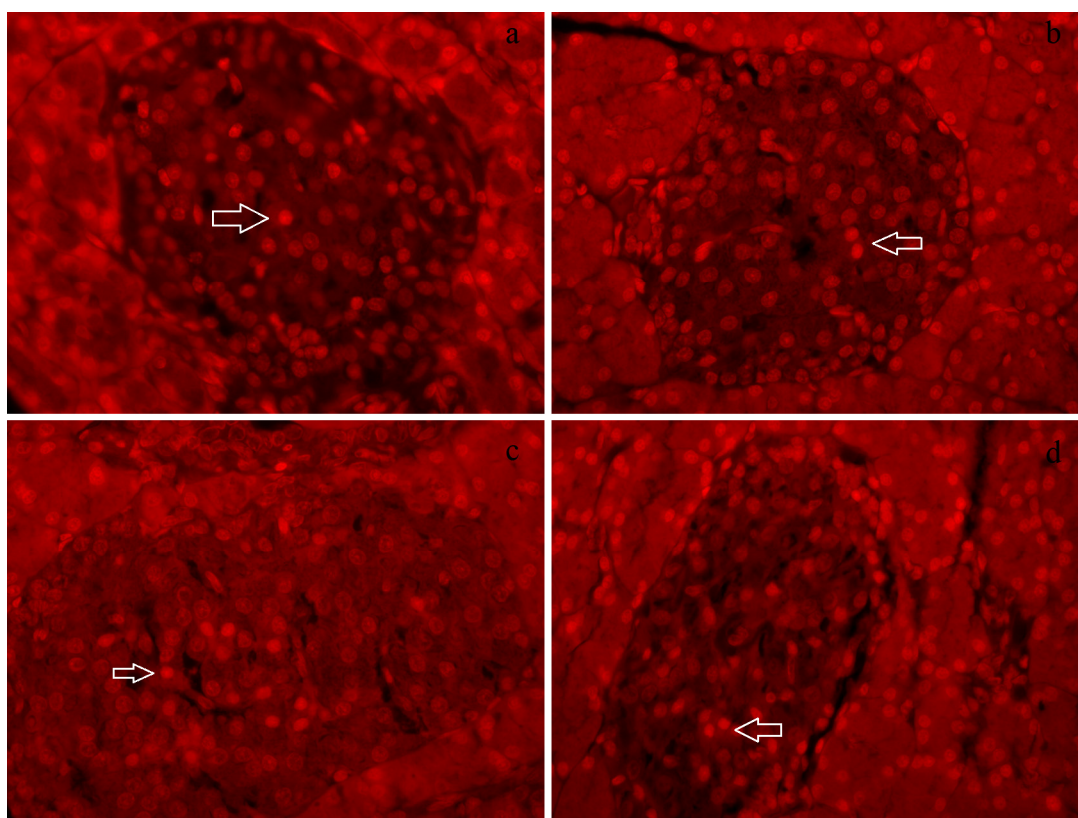
	Wilks Lambda	F	p
Metimazol	0.7793	0.897	0.5172
Saharoza	0.7180	1.244	0.3285
M*S	0.7670	0.962	0.4762

Endokrini pankreas

Histološka analiza endokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije

Specifično pokazivanje apoptotskih promena

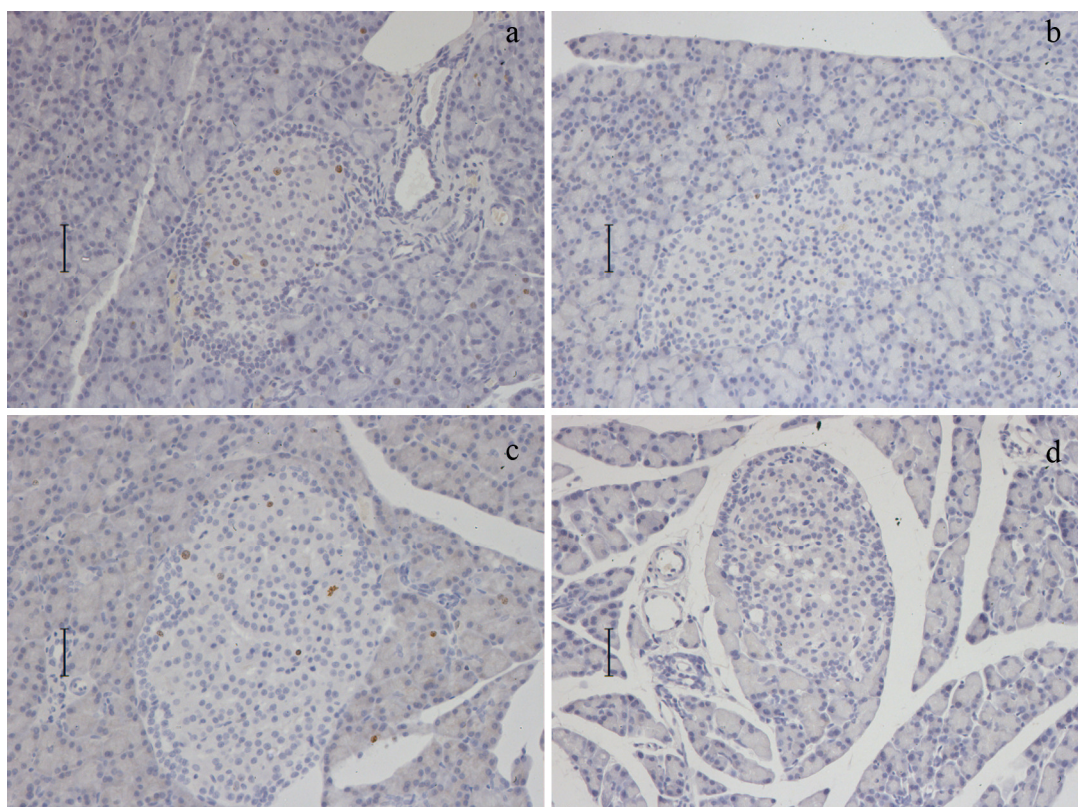
Apoptotski nukleusi u Langerhansovim ostrvcima markirani propidijum jodidom po svom jačem i uniformnom obojenju jasno se razlikuju od nukleusa živih ćelija. Prisutni su u ostrvcima svih grupa u veoma malom broju, i to u njihovim središnjim regionima, na pozicijama koje korespondiraju β -ćelijama (Slika 4.16.). Na osnovu dobijenih rezultata ne može se govoriti o razlikama u nivou ćelijskog umiranja u zavisnosti od specifičnih eksperimentalnih uslova.



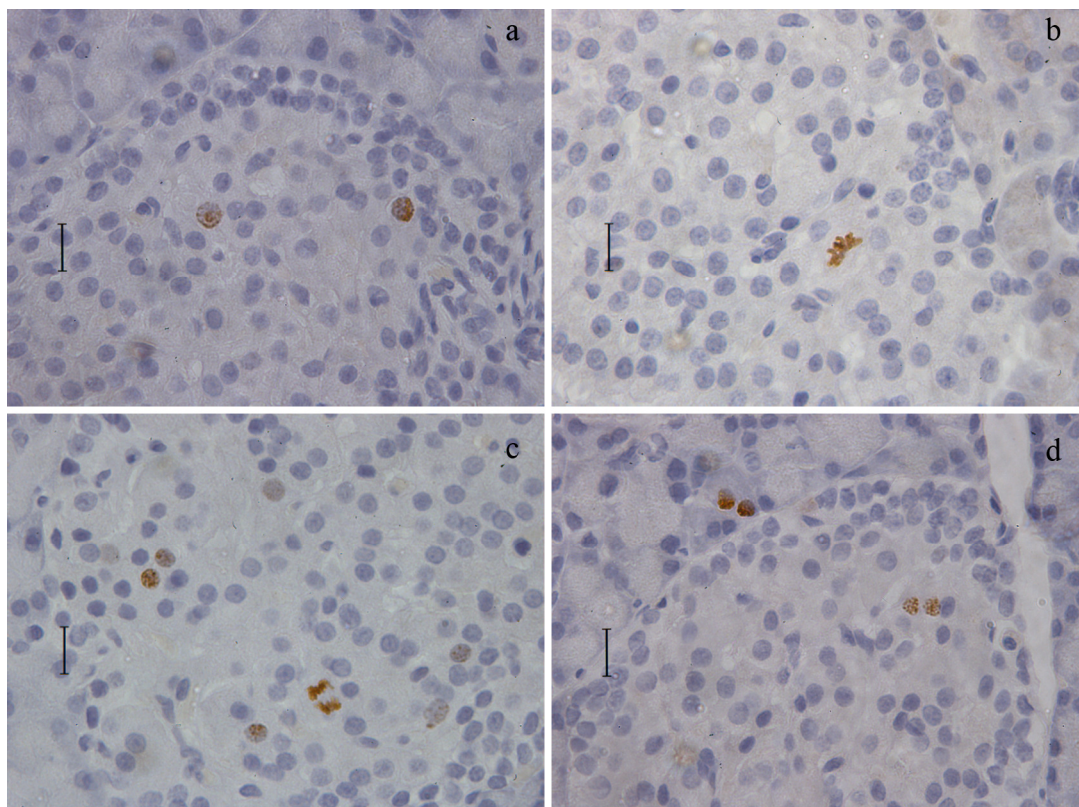
Slika 4.16. Bojenje propidijum jodidom demonstrira retke apoptotske ćelije (strelice) u centralnim regionima Langerhansovih ostrvaca svih grupa životinja. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x40)

Imunohistohemijska lokalizacija Ki67

Protein Ki67 lokalizovan je u regionu nukleusa, odnosno naslednog materijala. U kontrolnoj grupi imunopozitivnost na Ki67 pokazivale su samo β -ćelije Langerhansovih ostrvaca (Slika 4.17.a). Kod metimazolom tretiranih životinja smanjuje se broj β -ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa, ali se u malom broju pojavljuju imunopozitivne α -ćelije (Slika 4.17.b). U nešto većem broju imunopozitivne β - i α -ćelije prisutne su u ostrvcima saharozne grupe, dok pri istovremenom dejstvu metimazola i saharoze pozitivnost potpuno izostaje (Slika 4.17.c i d). Hromozomski aranžman koji odgovara nekoj od faza mitoze primećen je samo u β -ćelijama K i S grupe (Slika 4.18.), dok je imunopozitivnost u drugim grupama otkrivala isključivo intaktne nukleuse koji se nalaze u nekoj od pripremnih, ne-mitotskih faza ćelijskog ciklusa.



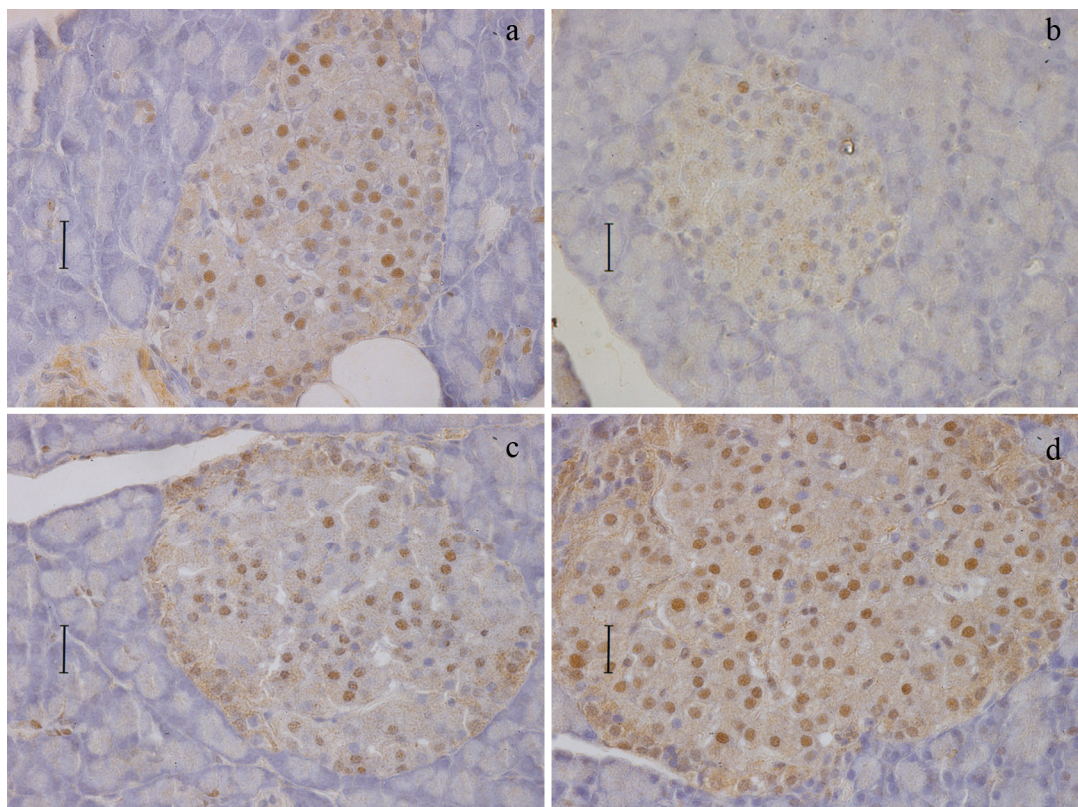
Slika 4.17. Nukleusi imunopozitivni na Ki67 odlika su ćelija u deobi. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20)



Slika 4.18. Mitoza β -ćelija Langerhansovih ostrvaca: profaza (a), metafaza (b), anafaza (c) i telofaza (d) vidljive su nakon Ki67 imunohistohemijskog bojenja. (a-K grupa; b-S grupa; c-K grupa; d-S grupa; x63)

Imunohistohemijska lokalizacija PDX1

U endokrinom pankreasu u kontrolnoj grupi životinja uočena je umereno jaka imunopozitivna reakcija u nukleusima funkcionalnih β -ćelija (Slika 4.19.a). Slabija reakcija i manji broj pozitivnih nukleusa u Langerhansovim ostrvcima prisutan je kod grupe tretirane metimazolom (Slika 4.19.b), dok obe grupe koje su unosile saharozu imaju upadljivo jaču imunopozitivnu reakciju u nukleusima β -ćelija (Slika 4.19.c i d).

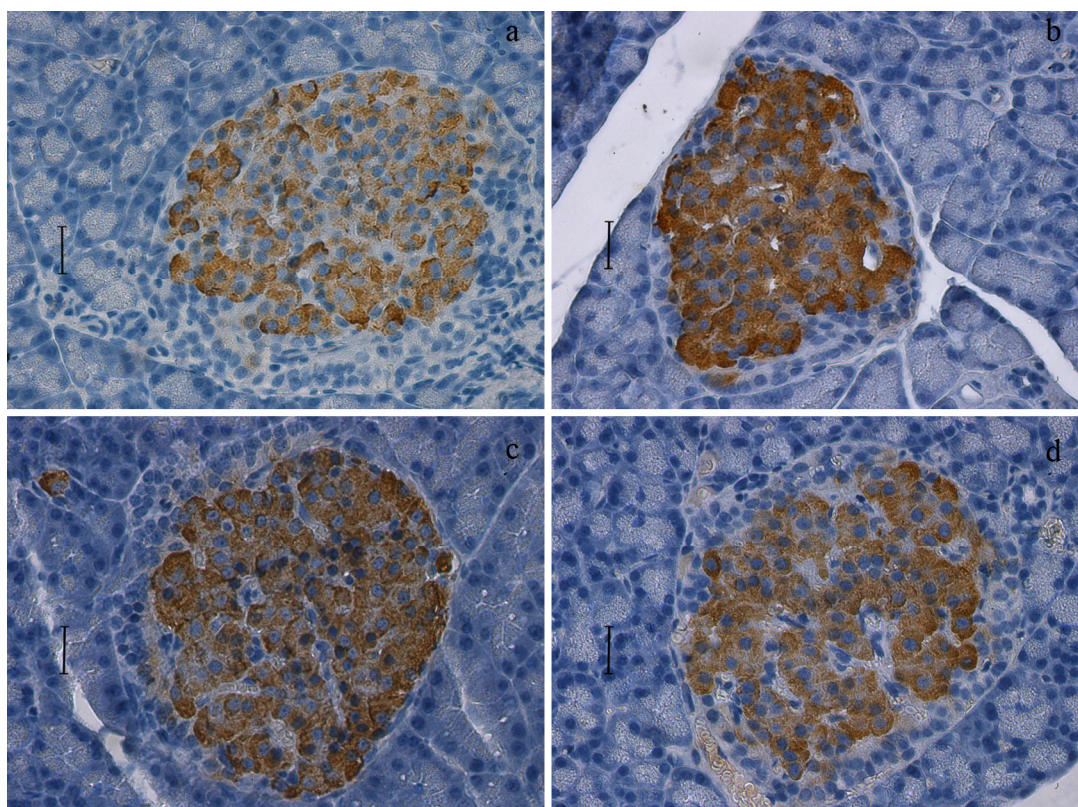


Slika 4.19. Nukleusi ćelija Langerhansovih ostrvaca pozitivni na transkripcioni faktor PDX1 pripadaju funkcionalnim β -ćelijama. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x40)

Imunohistohemijska lokalizacija insulina

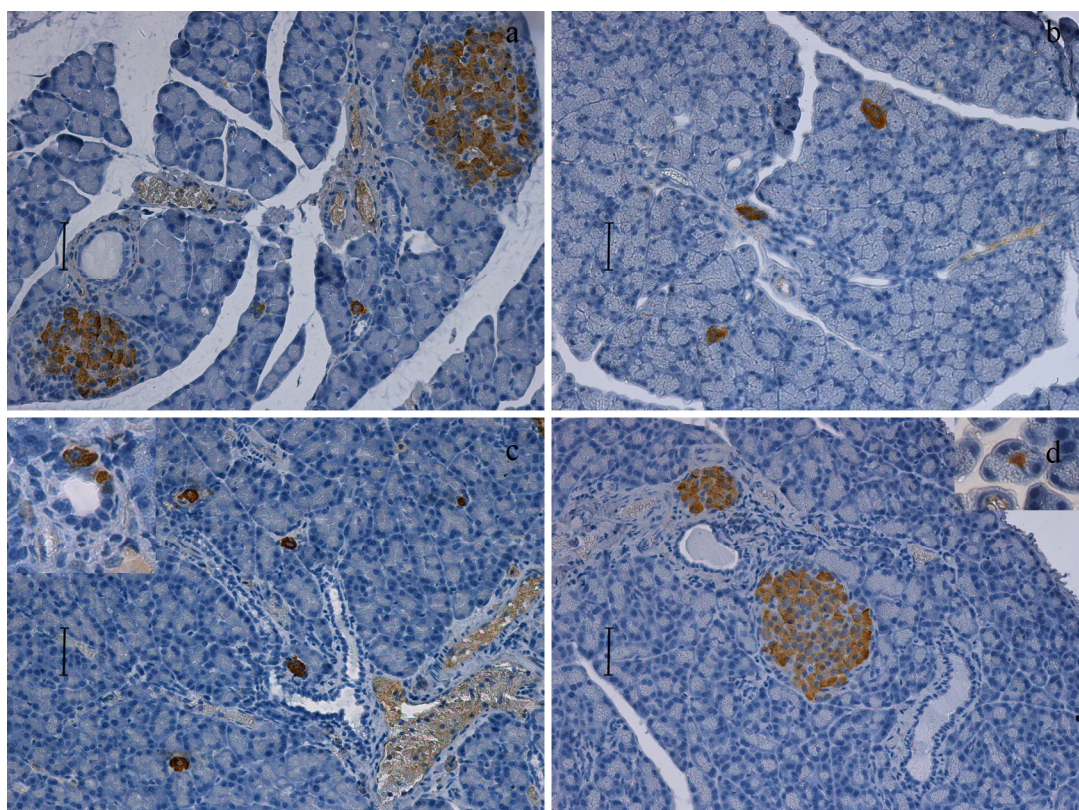
Najzastupljenije β -ćelije Langerhansovih ostrvaca proizvode insulin koji se do momenta sekrecije u vanćelijsku sredinu nalazi u granulama, zahvaljujući čemu se ove ćelije imunohistohemijski jasno razlikuju od drugih tipova endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca.

Karakteristično braon obojenje uočava se u ćelijama središnjeg regiona ostrvaca, koje su prstenom od nešto gušće postavljenih ne- β -ćelija odvojene od egzokrinog pankreasa (Slika 4.20.). Pojedinačne β -ćelije nalaze se i na samoj periferiji Langerhansovih ostrvaca u svim grupama. Malo jača imunopozitivna reakcija detektovana je u grupi koja je tretirana metimazolom.



Slika 4.20. Imunohistohemijska lokalizacija insulina u citoplazmi centralno postavljenih β -ćelija Langerhansovih ostrvaca malo je jačeg intenziteta kod životinja M grupe. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x40)

Detaljna analiza histoloških preseka pankreasa pokazala je da su imunohistohemijski obeležene pojedinačne β -ćelije prisutne i van Langerhansovih ostrvaca. Insulin-pozitivne ćelije nalaze se kod svih grupa životinja u okviru epitela izvodnih kanala ili u njegovoj neposrednoj blizini (inserti na slici 4.21.c i d). Na preparatima metimazolom tretiranih životinja primećene su u malom broju pojedinačne β -ćelije „uronjene“ u egzokrine acinuse (Slika 4.21.b), dok se na presecima pankreasa saharozom tretiranih životinja ovakve ćelije sreću u znatno većem broju (Slika 4.21.c).

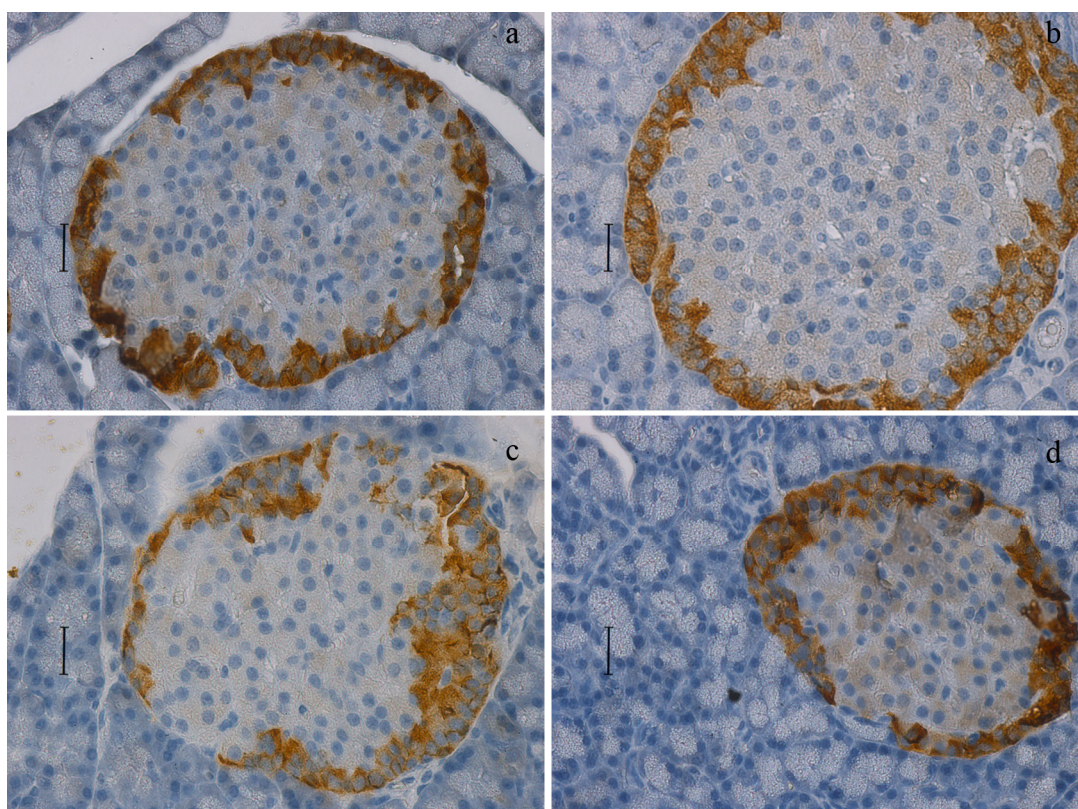


Slika 4.21. Pojedinačne insulin-pozitivne ćelije prisutne su i van Langerhansovih ostrvaca. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20, inserti x40)

Imunohistohemijska lokalizacija glukagona

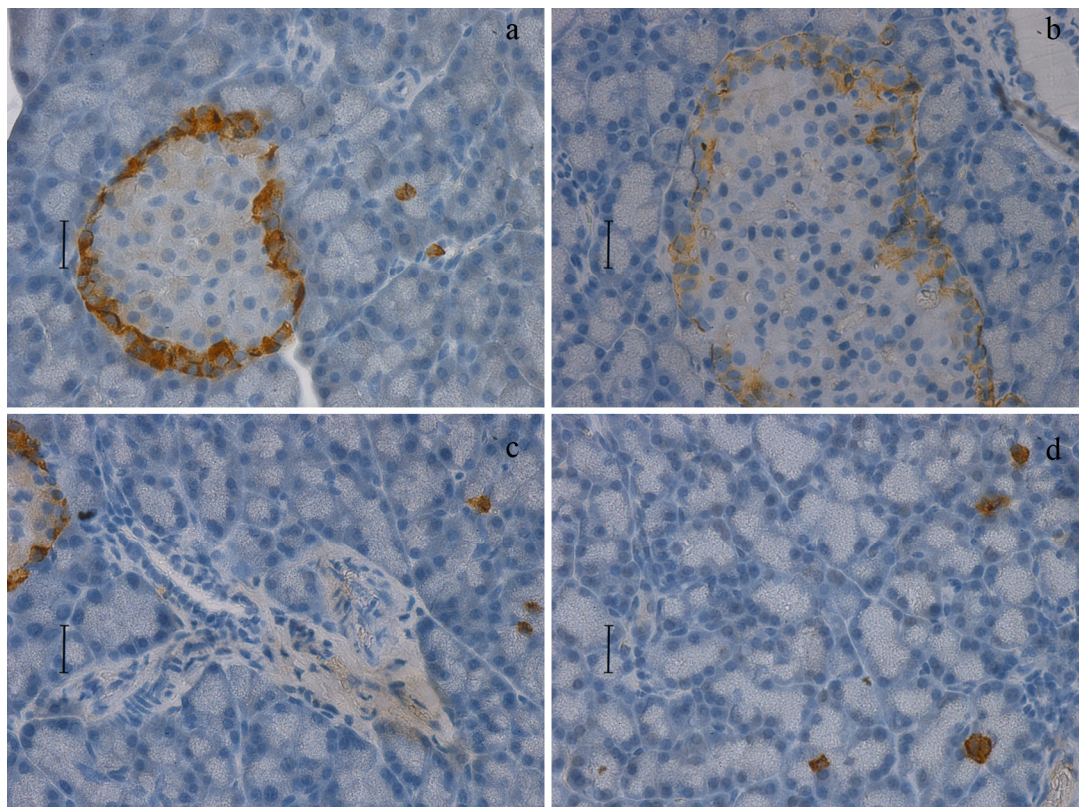
Glukagon produkujuće α -ćelije druge su po brojnosti endokrine ćelije Langerhansovih ostrvaca. U citoplazmi ovih ćelija glukagon se nalazi u sekretnim granulama, analogno insulinu u β -ćelijama.

Imunolokalizovane α -ćelije raspoređene su u vidu prstena na obodu Langerhansovih ostrvaca, razdvajajući centralno pozicionirane β -ćelije od egzokrinog pankreasa. Kod svih grupa na presecima pankreasa javlja se diskontinuiran prsten α -ćelija (Slika 4.22.). Reakcija je u svim grupama bila umerenog do jakog intenziteta.



Slika 4.22. Imunohistohemijska lokalizacija glukagona u citoplazmi periferno postavljenih α -ćelija Langerhansovih ostrvaca. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x40)

Pojedinačne α -ćelije u malom broju nalaze se i van Langerhansovih ostrvaca, među acinusnim ćelijama (Slika 4.23.).

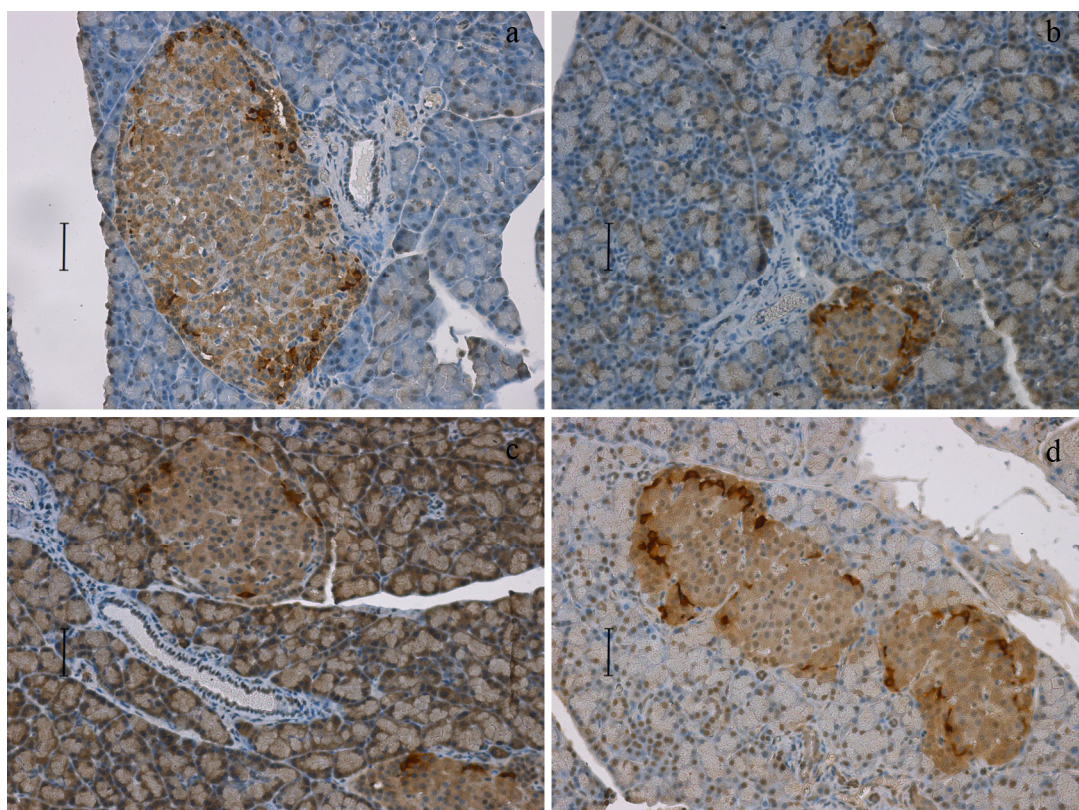


Slika 4.23. Pojedinačne glukagon-pozitivne ćelije prisutne su i van Langerhansovih ostrvaca. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x40)

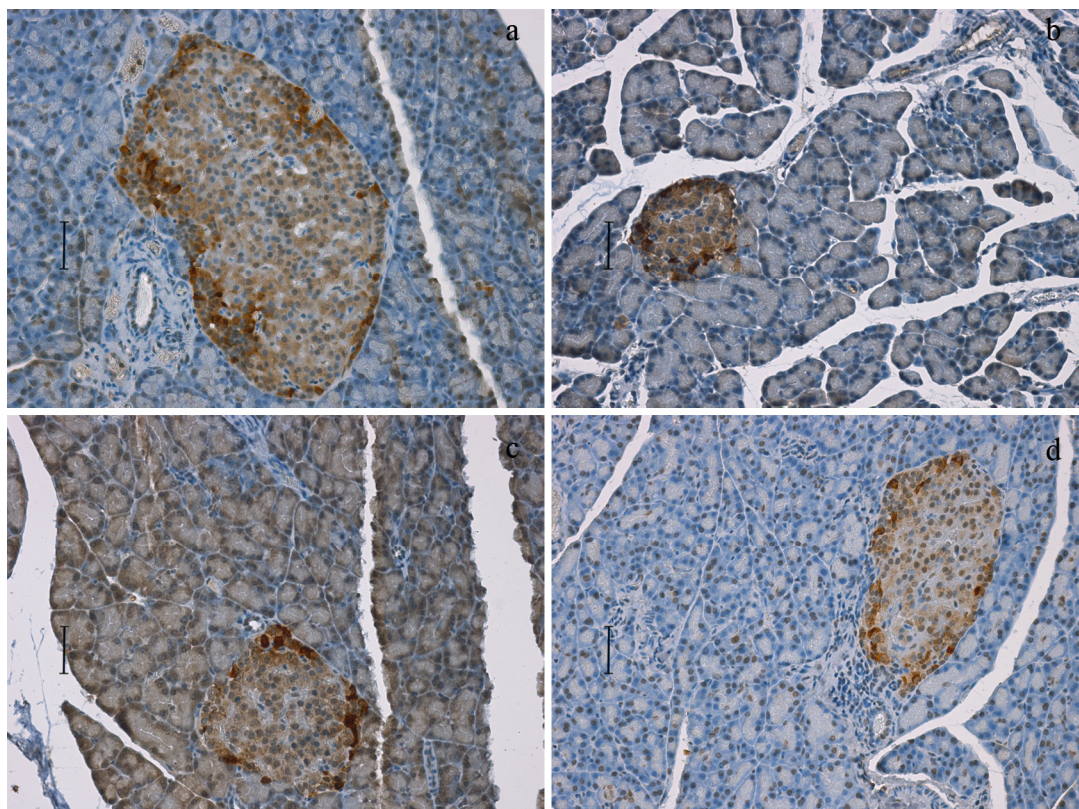
Imunohistohemijska lokalizacija somatostatina i pankreasnog polipeptida

Najmalobrojnije ćelije endokrinog pankreasa su D-ćelije i PP-ćelije, u čijoj se citoplazmi, upakovani u unutrašnjosti sekretnih granula, nalaze njihovi sintetski proizvodi somatostatin odnosno pankreasni polipeptid.

Oba tipa ćelija nalaze se u perifernom regionu Langerhansovih ostrvaca. Zastupljene su u malom broju kod svih grupa životinja (Slika 4.24. i 4.25.). Specifičnost somatostatinskih ćelija je njihov nepravilan oblik, odnosno odlikuje ih prisustvo citoplazmatskih procesusa.



Slika 4.24. Imunohistohemijska lokalizacija somatostatina u citoplazmi periferno postavljenih D-ćelija Langerhansovih ostrvaca. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20)

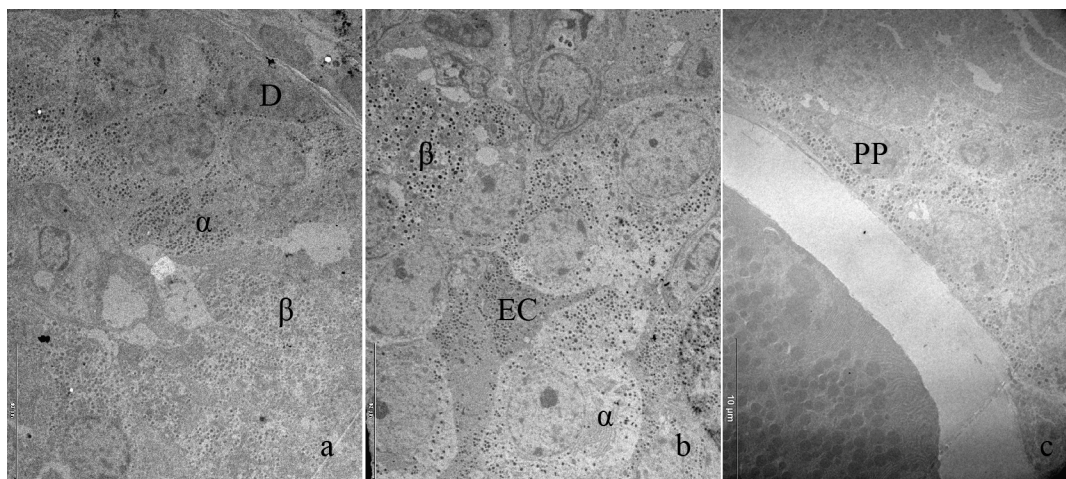


Slika 4.25. Imunohistohemijska lokalizacija pankreasnog polipeptida u citoplazmi periferno postavljenih PP-ćelija Langerhansovih ostrvaca. (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x20)

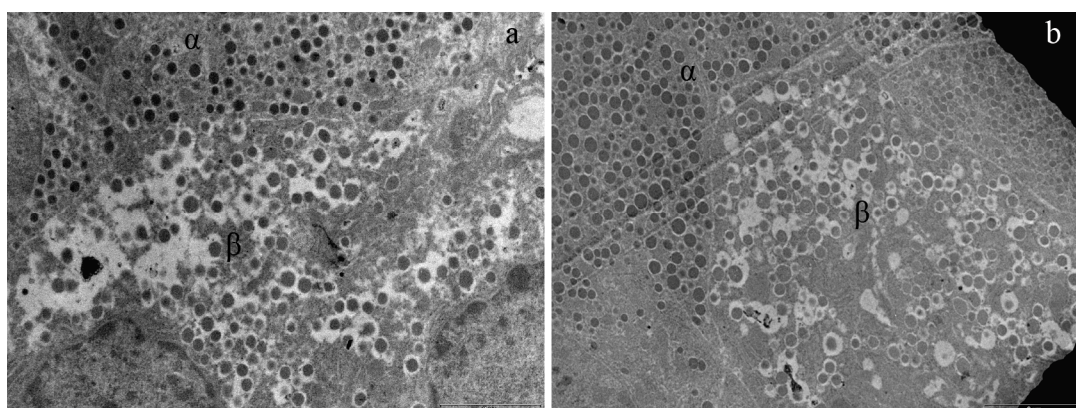
U izuzetno malom broju, kod svega dve životinje primećene su pojedinačne PP-ćelije u acinusima (S grupa), a samo kod jedne jedinke uočene su pozitivne D-ćelije van Langerhansovih ostrvaca (MS grupa).

Analiza endokrinog pankreasa na nivou elektronske mikroskopije

Endokrine ćelije Langerhansovih ostrvaca najlakše se međusobno razlikuju po izgledu sekretnih granula (Slika 4.26.). β -ćelije imaju vrlo karakteristične granule: u samom središtu smešten je elektron-tamni proteinski sadržaj koji je od membrane granule odvojen svetlim haloom (Slika 4.27.). Granule α -ćelija izrazito su tamne i ujednačene su po veličini (Slika 4.27.). Somatostatinske granule D-ćelija nešto su veće od granula α -ćelija, ali heterogene elektron-gustine – mogu biti svetlije i tamnije. PP-ćelije odlikuju se najsitnijim granulama, nejednake veličine. Ponekad se u ostrvcima mogu uočiti i EC ćelije sa granulama nepravilno-ovalnog oblika.



Slika 4.26. Različiti tipovi endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca najlakše se razlikuju po izgledu sekretnih granula. (a, b i c-K grupa; x2650)

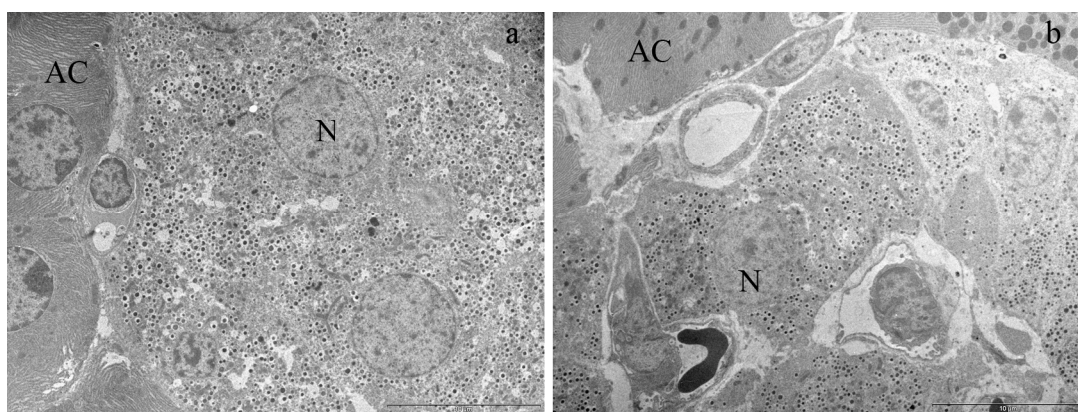


Slika 4.27. Granule α - i β -ćelija jasno se razlikuju po svom izgledu. (a-S grupa, x8800; b-S grupa, x8800)

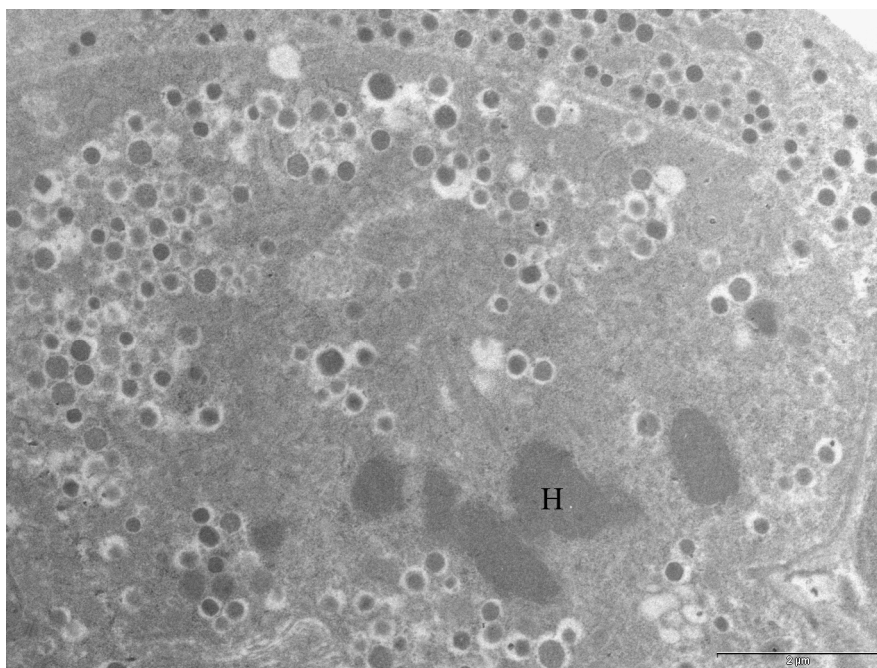
Snimci sa elektronskog mikroskopa potvrdili su i upotpunili sliku dobijenu pomoću svetlosnog mikroskopa. Najbrojnije ćelije u ostrvcima su β - i α -ćelije, dok se u mnogo manjem broju sreću D- i PP-ćelije, a sasvim sporadično EC ćelije.

β -ćelije

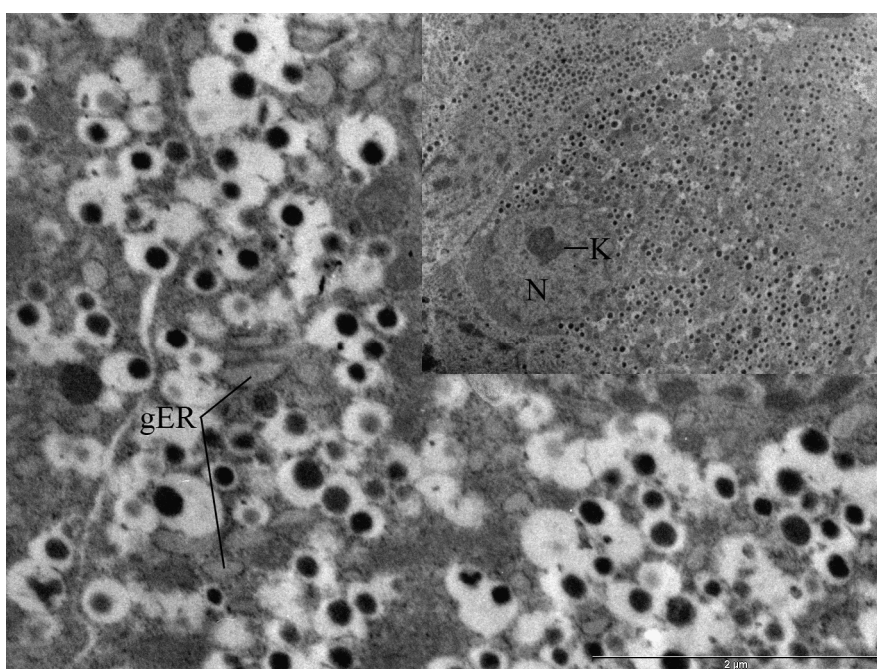
Iako je većina β -ćelija smeštena u centralnom regionu ostrvaca, u kontrolnoj i S grupi životinja primećene su, kao i pod svetlosnim mikroskopom, β -ćelije na samom obodu ostrvaca, u neposrednom kontaktu sa egzokrinim pankreasom (Slika 4.28.). Nukleusi β -ćelija svih grupa po pravilu su euhromatski. β -ćelija u mitozu, bez uobičenog nukleusa uočena je u S grupi životinja (Slika 4.29.). Veoma sintetski aktivni nukleusi sa izraženim perinukleolusnim Kahalovim telom prisutni su kod M grupe životinja (insert na slici 4.30.). Tada je i gER malo proširenijeg lumena i ispunjen srednje elektron-gustim materijalom (Slika 4.30.). Goldži kompleks najbolje je uočljiv kod M grupe životinja, pogotovo kod β -ćelija sa granulama većeg haloa (Slika 4.31.)



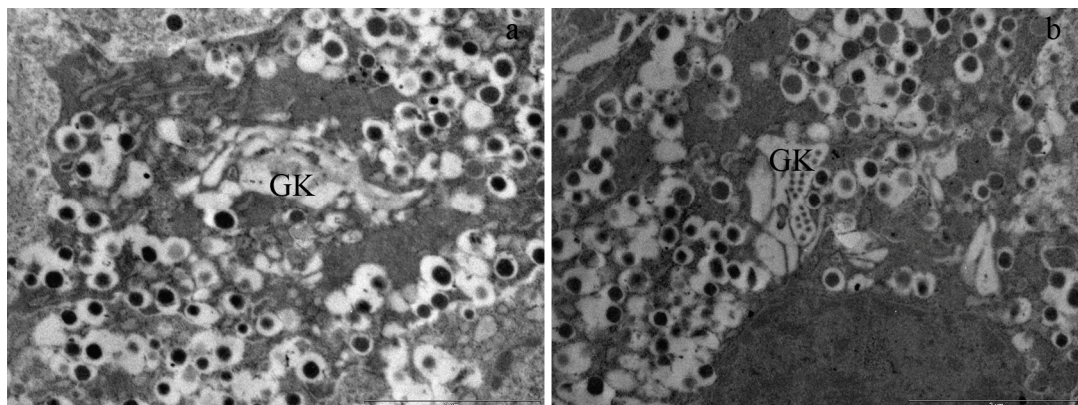
Slika 4.28. β -ćelije u neposrednom kontaktu sa acinusnim ćelijama egzokrinog pankreasa. N-nukleusi β -ćelija, AC-acinusne ćelije. (a-K grupa; b-S grupa; x2650)



Slika 4.29. Mitoza β -ćelije. H-hromozomi. (S grupa; x8800)

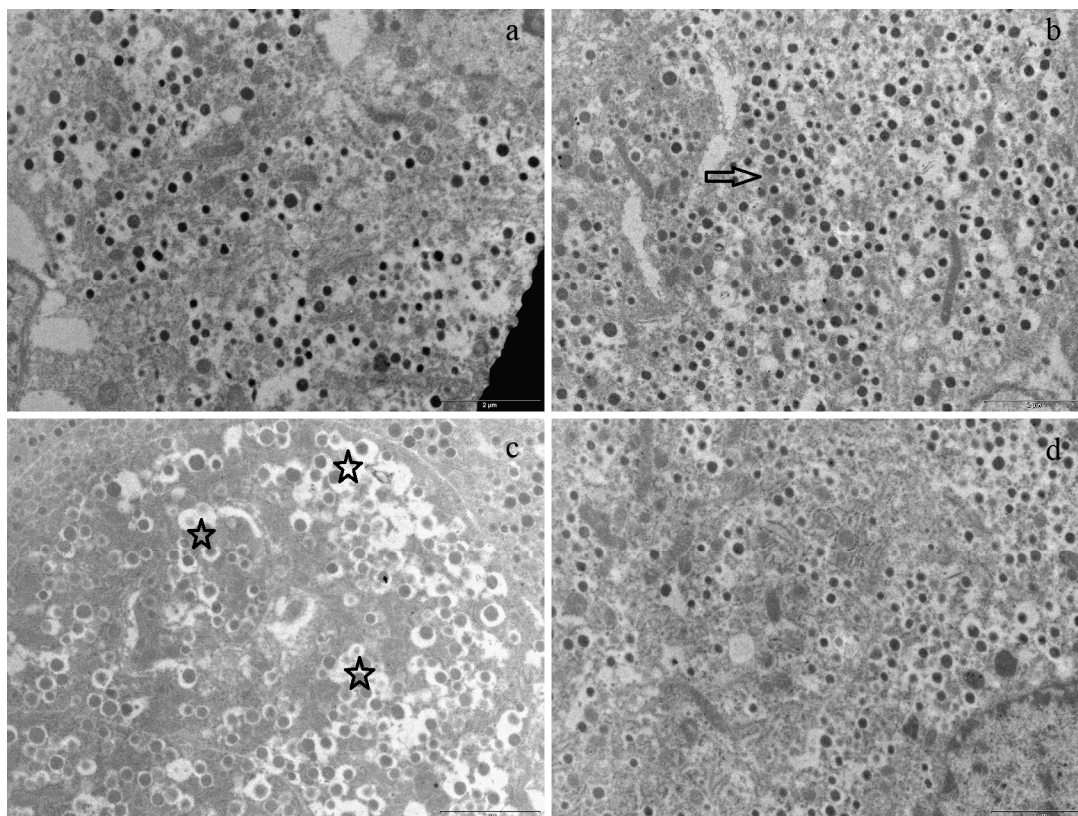


Slika 4.30. Dilatirane cisterne gER-a jače se kontrastiraju. Insert: perinukleolusno pozicionirano Kahalovo telo (K) u nukleusu (N) β -ćelija. (M grupa; x15000; insert x2650)

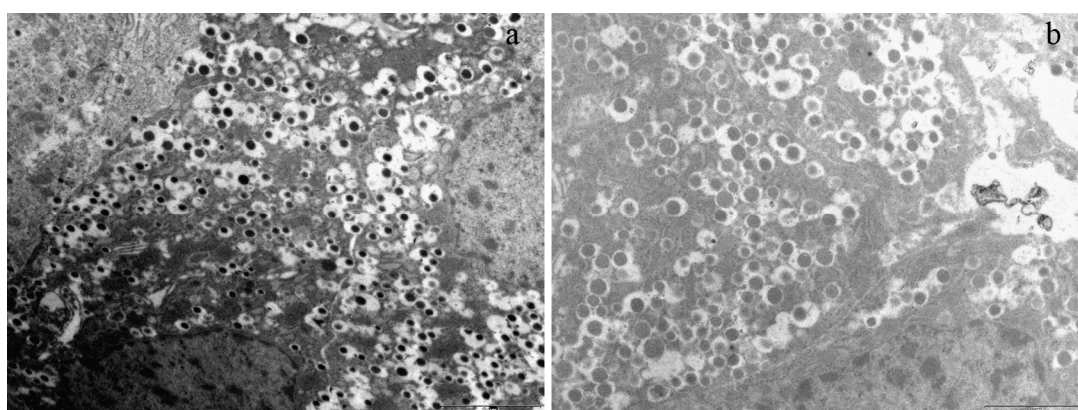


Slika 4.31. Proširene sakule Goldži kompleksa (GK). (a, b-M grupa; x15000)

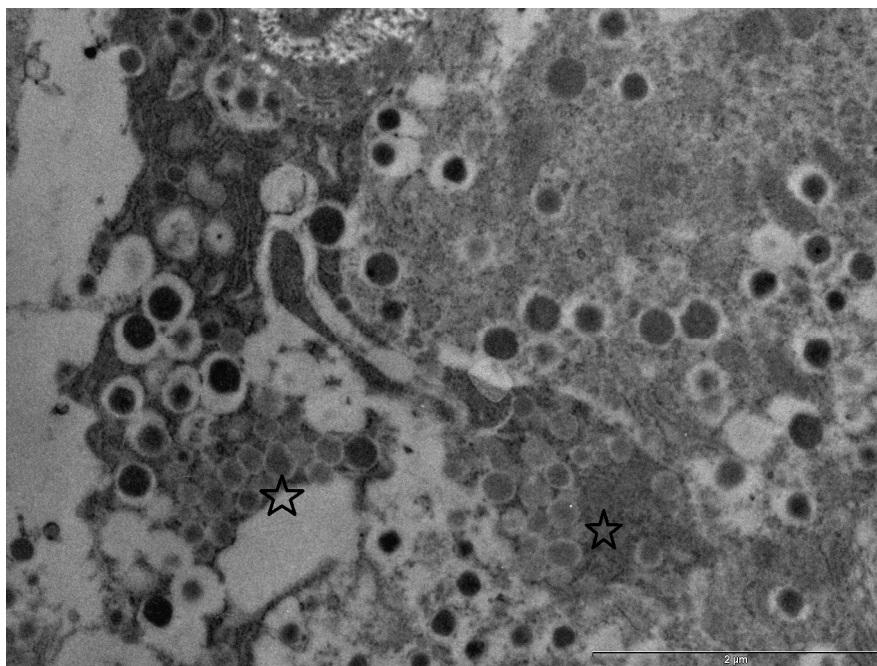
Na tkivnim presecima oblik proteinskog kristaloida u granulama β -ćelija varira od okruglastog do poligonalnog, u zavisnosti od zrelosti sekretnih granula. Veličina halooa takođe može varirati. Sekretne granule u kontrolnoj grupi uobičajenog su izgleda, centralni tamni kristaloid okružen je svetlim prostorom umerene širine (Slika 4.32.a). Kod svih grupa pored ovakvog tipa, sreću se i ćelije ispunjene granulama sa mnogo većim haloom, što doprinosi sveukupno „šupljikavom“ izgledu tih β -ćelija (Slika 4.33.). Ove ćelije naročito su brojne u S grupi. Sekretne granule malo su gušće raspoređene u citoplazmi β -ćelija M grupe (Slika 4.32.b). U toj grupi primećene su i ćelije sa klasterima gusto zbijenih nezrelih sekretnih granula, dok su u ostalom delu citoplazme prisutne uobičajene granule (Slika 4.34.). Zrele granule, sa poligonalnim kristaloidom najbrojnije su u S grupi životinja. U ovoj grupi životinja granule su delovale nešto krupnije, pa je verovatno zato primećeno da se ponekad susedne granule „slivaju“ (Slika 4.32.c). Egzocitoza sadržaja granula β -ćelija nije uočena kod M grupe, a jeste u S grupi (Slika 4.35.). Sekretne granule β -ćelija MS grupe najsličnije su po izgledu, veličini i zastupljenosti granulama kontrolnih životinja.



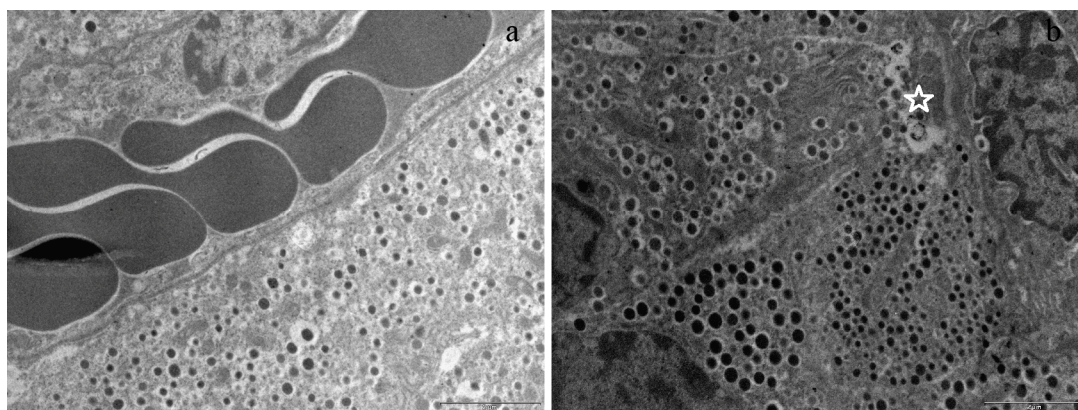
Slika 4.32. Izgled, veličina i zastupljenost granula β -ćelija Langerhansovih ostrvaca varira u zavisnosti od eksperimentalnih uslova. Granule su gušće pozicionirane u M grupi (strelica), a „slivanje“ granula uočava se u S grupi (zvezdice). (a-K grupa; b-M grupa; c-S grupa; d-MS grupa; x8800)



Slika 4.33. Granule β -ćelija mogu posedovati veliki halo. (a-M grupa; b-S grupa; x8800)

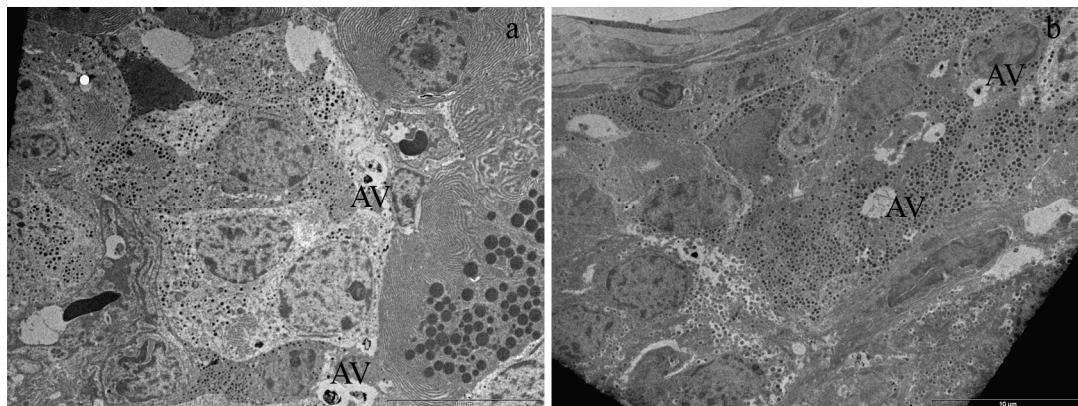


Slika 4.34. Gusto postavljene granule u jednom regionu β -ćelije (zvezdice). (M grupa; x15000)



Slika 4.35. Pražnjenje sekretirnih granula β -ćelija nije primećeno u M grupi, a jeste kod životinja S grupe (zvezdica). (a-M grupa; b-S grupa; x8800)

Proces autofagije primećen je u manjoj meri kod endokrinih ćelija životinja K i M grupe, a nešto češće u S grupi, premda je uvek bilo teško sa sigurnošću utvrditi o kom tipu ćelija se radi (Slika 4.36.).



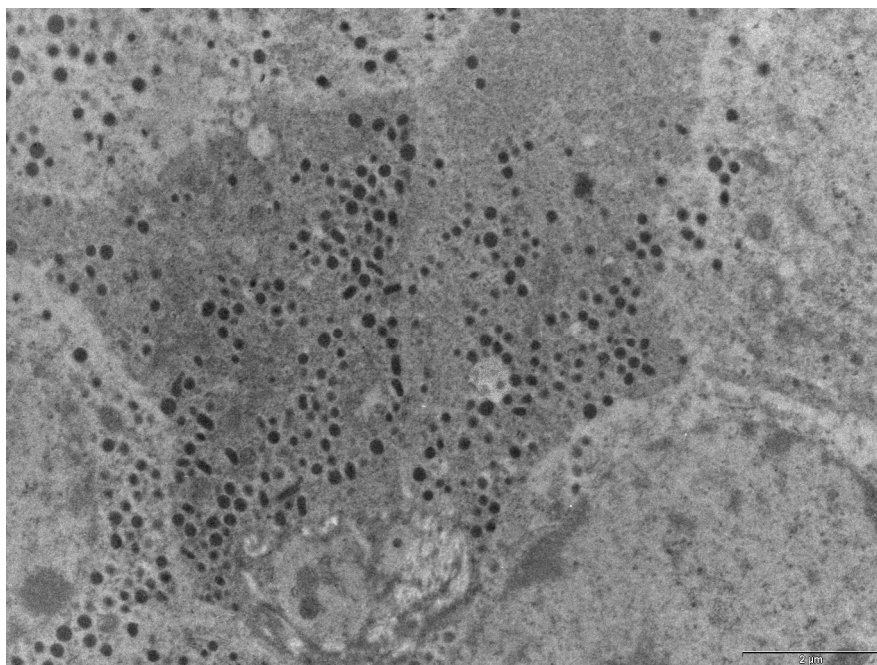
Slika 4.36. Autofagne vakuole (AV) u endokrinim ćelijama Langerhansovih ostrvaca. (a-M grupa; b-S grupa; x2650)

Ostale endokrine ćelije

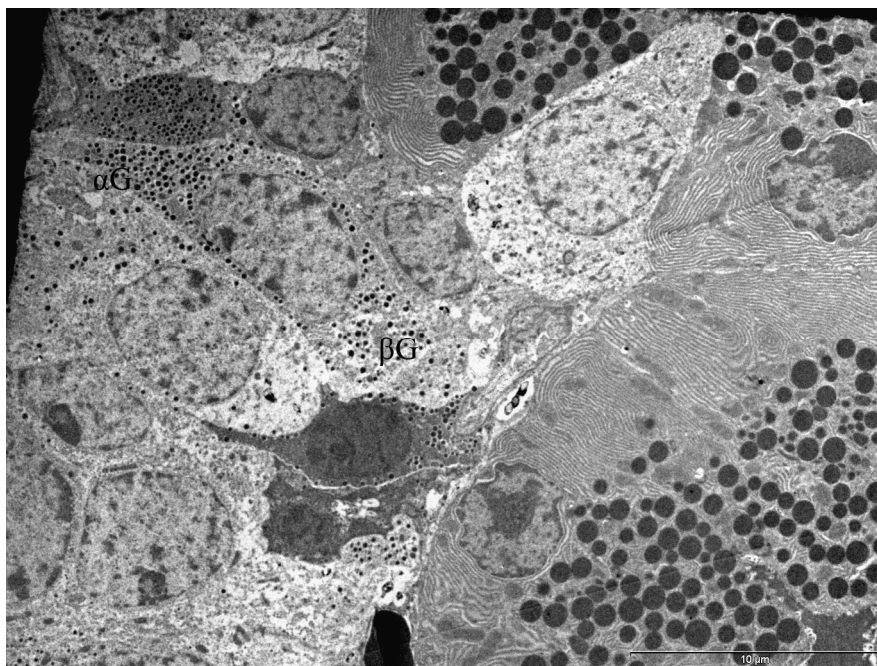
Većina endokrinih ćelija nalazi se u okviru Langerhansovih ostrvaca, premda su registrovane i pojedinačne ćelije smeštene uz acinusne ćelije egzokrinog pankreasa (Slika 4.37.). U izgledu i ultrastrukturnoj organizaciji α -, D- i PP-ćelija Langerhansovih ostrvaca nisu uočene razlike između grupa. U K i S grupi veoma retko registrovane su EC ćelije u čijoj citoplazmi se nalaze granule nepravilno-elipsastog oblika (Slika 4.38.). Međutim u M grupi životinja primećen je jedan intermedijaran tip ćelije. U citoplazmi ove ćelije prisutna su dva tipa granula: tamne, bez haloa i drugi tip granula - sa haloom. Tamne granule bez haloa koje po svom izgledu odgovaraju granulama α -ćelija smeštene su u neposrednoj blizini nukleusa i ima ih nešto više od granula sa haloom, koje liče na granule β -ćelija (Slika 4.39.).



Slika 4.37. Pojedinačna endokrinska ćelija (E) smeštena uz acinusne ćelije (AC) egzokrinog pankreasa. (K grupa; x2650)



Slika 4.38. Sekretne granule EC ćelije nepravilno su elipsastog oblika. (K grupa; x7100)



Slika 4.39. Čelija sa dva tipa sekretivnih granula: iznad nukleusa smeštene su granule koje po izgledu podsećaju na granule α -čelija (α G), i ispod nukleusa u manjem broju prisutne su granule koje liče na granule β -čelija (β G). (M grupa; x2650)

Stereološka analiza endokrinog pankreasa na nivou svetlosne mikroskopije

Stereološko ispitivanje Langerhansovih ostrvaca

Preseci pankreasa na kojima je imunohistohemijski lokalizovan insulin poslužili su za stereološku analizu Langerhansovih ostrvaca. U Tabeli 21 prikazane su srednje vrednosti i standardne greške za volumensku gustinu ostrvaca, njihovu numeričku gustinu, apsolutni broj i masu ostrvaca. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da ne postoji uticaj unosa saharoze na ispitivane stereološke osobine, dok je tretman metimazolom uticao samo na numeričku gustinu i apsolutni broj ostrvaca (Tabela 22). Međutim nakon Bonferoni komparacije nije utvrđena statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa (Tabele 23 i 24), iako pod dejstvom metimazola (M i MS grupe) postoji tendencija povećanja i numeričke gustine i apsolutnog broja ostrvaca u odnosu na eutireoidne grupe životinja.

Tabela 21. Stereomorfometrijska ispitivanja Langerhansovih ostrvaca

	K	M	S	MS
V_v (mm ⁰)	0.0121±0.0027	0.0165±0.0022	0.0142±0.0022	0.0137±0.0021
N_v (N/cm ³)	8918.6±1685.8	16214.0±2068.9	8892.3±1472.6	17858.5±4201.0
Apsolutni broj ostrvaca	9188.3±1654.6	12489.4±1422.8	7188.9±1353.1	13914.5±3319.3
Masa ostrvaca (mg)	12.9±2.6	13.4±1.9	11.6±1.6	11.2±1.5

Tabela 22. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) stereomorfometrijskih ispitivanja Langerhansovih ostrvaca. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

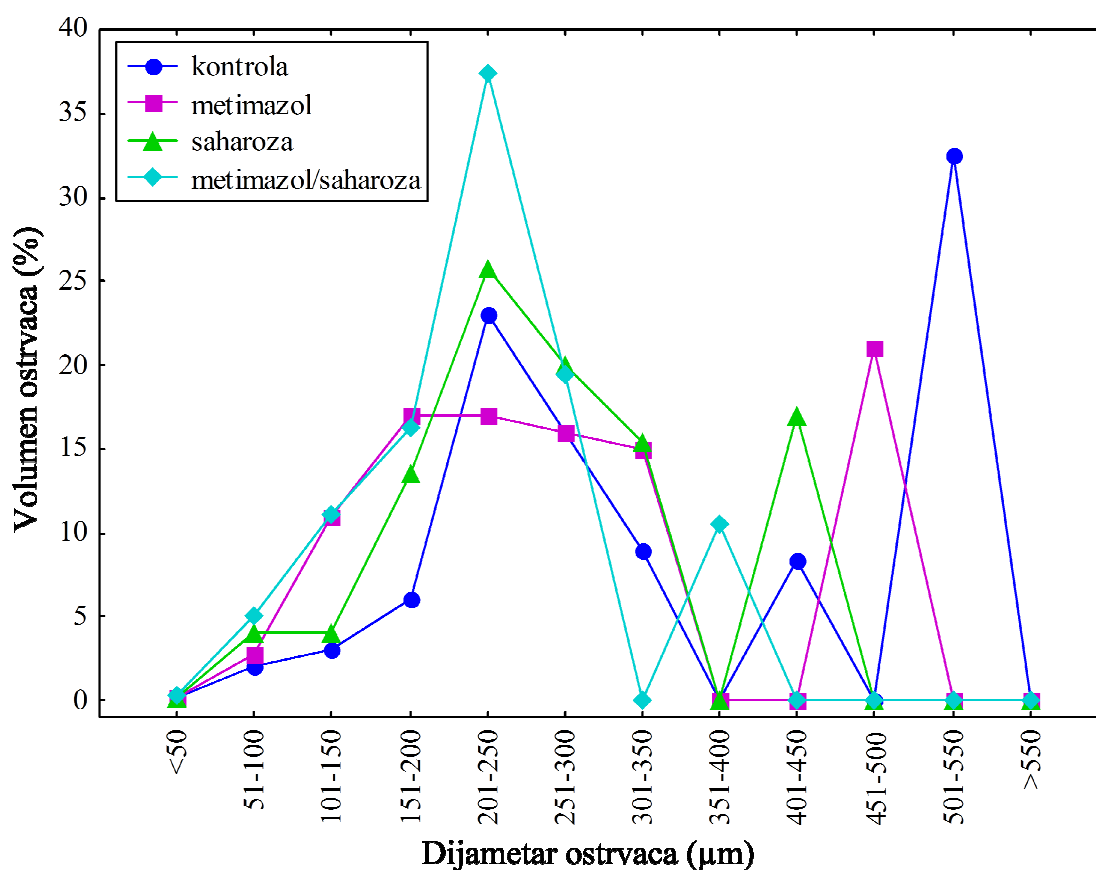
	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
V_v (mm ⁰)	0.7060	0.4090	0.0218	0.8838	1.1689	0.2904
N_v (N/cm ³)	8.2210	0.0085	0.0814	0.7778	0.0868	0.7708
Apsolutni broj ostrvaca	4.7962	0.0385	0.0157	0.9012	0.5595	0.4617
Masa ostrvaca (mg)	0.0050	0.9440	0.8986	0.3526	0.0630	0.8039

Tabela 23. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse numeričke gustine za četiri grupe

N_v (N/cm ³)	K	M	S	MS
K				
M	0.6105			
S	1.0000	0.4822		
MS	0.2125	1.0000	0.1423	

Tabela 24. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse apsolutnog broja ostrvaca za četiri grupe

Apsolutni broj ostrvaca				
	K	M	S	MS
K				
M	1.0000			
S	1.0000	0.6877		
MS	0.9437	1.0000	0.2060	



Grafikon 1. Procentualna zastupljenost volumena ostrvaca različitih dijametara u ukupnom volumenu endokrinog pankreasa

Veličina ostrvaca bila je veoma varijabilna u sve četiri grupe, tj. srednji dijametar ostrvaca kretao se od manje od 50 µm pa do preko 550 µm u pojedinim grupama (Grafikon 1). Distribucija ukupnog ostrvskog volumena među ostrvcima

različitih dijametarskih klasa nije se razlikovala između četiri grupe životinja kad su u pitanju ostrvca manjih i srednjih dijametara (do 300 μm). Međutim, razlike su postojale u učešću ostrvaca velikih dijametara u ukupnom ostrvskom volumenu. Ostrvca najvećeg dijametra najviše su doprinosila ukupnom ostrvskom volumenu kontrolnih životinja, dok se u preostale tri grupe sa smanjenjem dijametara ostrvaca smanjivalo i njihovo učešće u ukupnom volumenu endokrinog pankreasa. Udruženo dejstvo metimazola i saharoze najviše je uticalo na odsustvo ostrvaca većih dijametara (većih od 450 μm) u ukupnom endokrinom volumenu.

Stereološka ispitivanja ćelija Langerhansovih ostrvaca

Na tkivnim presecima pankreasa na kojima su imunohistohemijski obeleženi insulin, glukagon, somatostatin i pankreasni polipeptid analizirani su određeni stereološki parametri β -, α -, D- i PP-ćelija unutar Langerhansovih ostrvaca. Rezultati ovih analiza prikazani su u Tabelama 25, 26, 27 i 28.

Tabela 25. Rezultati stereomorfometrijskih ispitivanja β -ćelija

	K	M	S	MS
V_v β -ćelija (mm^0)	0.76 \pm 0.05	0.72 \pm 0.05	0.70 \pm 0.03	0.63 \pm 0.03
Površina β -ćelije (μm^2)	251.40 \pm 16.80	187.10 \pm 7.76	297.74 \pm 17.40	201.95 \pm 12.14
Masa β -ćelija (mg)	10.08 \pm 1.38	9.30 \pm 1.02	8.01 \pm 0.81	7.52 \pm 0.59
Broj β -ćelija po ostrvcu	26.90 \pm 3.48	31.68 \pm 3.27	22.72 \pm 3.46	33.18 \pm 5.65

Tabela 26. Rezultati stereomorfometrijskih ispitivanja α -ćelija

	K	M	S	MS
V_v α -ćelija (mm^0)	0.44 \pm 0.05	0.43 \pm 0.03	0.48 \pm 0.04	0.53 \pm 0.08
Površina α -ćelije (μm^2)	194.21 \pm 23.55	170.08 \pm 11.58	164.22 \pm 11.89	171.14 \pm 17.19
Masa α -ćelija (mg)	5.99 \pm 0.76	4.81 \pm 0.44	6.50 \pm 0.85	5.24 \pm 1.11
Broj α -ćelija po ostrvcu	24.36 \pm 3.98	26.93 \pm 3.78	23.40 \pm 3.24	24.57 \pm 4.12

Tabela 27. Rezultati stereomorfometrijskih ispitivanja D-ćelija

	K	M	S	MS
V _v D ćelija (mm ⁰)	0.14±0.02	0.19±0.01	0.21±0.03	0.22±0.03
Površina D ćelije (µm ²)	266.52±27.79	263.70±16.50	258.74±13.12	301.32±43.74
Masa D ćelija (mg)	2.01±0.34	2.47±0.21	1.97±0.20	2.69±0.69
Broj D ćelija po ostrvcu	6.95±0.97	7.71±0.68	7.08±0.58	6.46±0.70

Tabela 28. Rezultati stereomorfometrijskih ispitivanja PP-ćelija

	K	M	S	MS
V _v PP ćelija (mm ⁰)	0.17±0.04	0.15±0.02	0.22±0.03	0.26±0.04
Površina PP ćelije (µm ²)	243.82±23.24	271.42±47.07	230.23±31.53	285.03±28.00
Masa PP ćelija (mg)	2.18±0.68	1.84±0.31	2.78±0.46	2.75±0.49
Broj PP ćelija po ostrvcu	11.59±0.86	9.77±2.94	13.59±1.79	7.86±0.99

Preliminarni MANOVA test nije pokazao postojanje uticaja ishrane saharozom i tretmana metimazolom na analizirane osobine α- i D-ćelija (Tabele 29 i 30), pa dalje analize za ova dva tipa ćelija nisu rađene.

Tabela 29. Multivarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) četiri osobine α-ćelija. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost.

	Wilks Lambda	F	p
Metimazol	0.8660	1.0057	0.4225
Saharoza	0.8963	0.7523	0.5656
M*S	0.9595	0.2744	0.8918

Tabela 30. Multivarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) četiri osobine D-ćelija. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost.

	Wilks Lambda	F	p
Metimazol	0.8694	0.7509	0.5690
Saharoza	0.8509	0.8761	0.4957
M*S	0.8662	0.7723	0.5559

Od svih ispitivanih parametara PP-ćelija dvofaktorska analiza varijansi pokazala je postojanje uticaja ishrane obogaćene saharozom na volumensku gustinu ovih ćelija i uticaj tretmana metimazolom na prosečan broj ćelija po ostrvcu (Tabela 31), ali nakon Bonferoni komparacije statistički značajne razlike između grupa nisu utvrđene (Tabele 32 i 33).

Tabela 31. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) četiri osobine PP-ćelija. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
V _v PP ćelija (mm ⁰)	0.0435	0.8361	4.5200	0.0421	0.6488	0.4271
Površina PP ćelije (μm ²)	1.4535	0.2377	0.0000	1.0000	0.1584	0.6936
Masa PP ćelija (mg)	0.1249	0.7263	2.0170	0.1662	0.0825	0.7759
Broj PP ćelija po ostrvcu	4.6438	0.0396	0.0007	0.9796	1.2447	0.2737

Tabela 32. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse volumenske gustine PP-ćelija za četiri grupe

V _v PP ćelija (mm ⁰)				
	K	M	S	MS
K				
M	1.0000			
S	1.0000	1.0000		
MS	0.6397	0.2723	1.0000	

Tabela 33. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse broja PP-ćelija za četiri grupe

Broj PP ćelija po ostrvcu				
	K	M	S	MS
K				
M	1.0000			
S	1.0000	0.8228		
MS	0.8379	1.0000	0.0671	

Za analizirane osobine β -ćelija dvofaktorska analiza varijansi pokazala je uticaj ishrane saharozom i tretmana metimazolom na površinu profila pojedinačne ćelije (Tabela 34). Bonferoni analiza varijanse ukazuje da tretman samo metimazolom i tretman metimazolom uz ishranu obogaćenu saharozom smanjuju površinu β -ćelije u odnosu na kontrolnu grupu, ali statistički značajna razlika postoji samo između kontrolne i M grupe (Tabele 25 i 35). Eutireoidna grupa životinja koja je hranjena saharozom nije imala statistički veću površinu ćelije u odnosu na kontrolu već samo u odnosu na hipotireoidne životinje (M i MS grupe).

Tabela 34. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) četiri osobine β -ćelija. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
V _v β -ćelija (mm ⁰)	1.551	0.2174	3.236	0.0766	0.167	0.6845
Površina β -ćelije (μm^2)	32.630	0.0000	4.770	0.0325	1.263	0.2652
Masa β -ćelija (mg)	0.4092	0.5246	3.7576	0.0568	0.0208	0.8858
Broj β -ćelija po ostrvcu	3.2697	0.0751	0.1007	0.7520	0.4547	0.5025

Tabela 35. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse površine jedne β -ćelije za četiri grupe

Površina β -ćelije (μm^2)	K	M	S	MS
	K			
M	0.0109			
S	0.1456	0.0000		
MS	0.0747	1.0000	0.0000	

Stereološka analiza β -ćelija endokrinog pankreasa na nivou elektronske mikroskopije

Sa elektron-mikrografija β -ćelija analizirane su brojnost granula po zadatoj jediničnoj površini, zastupljenost pojedinih granula, odnosno procenjivan je odnos zrelih naspram nezrelih granula i merena je prosečna površina preseka tamnog proteinskog sadržaja granula. Rezultati ovih ispitivanja dati su u Tabeli 36.

Tabela 36. Analiza granula β -ćelija

	K	M	S	MS
Nezrele granule (na 100 μm^2)	150.21 \pm 11.49	312.01 \pm 41.37	100.14 \pm 7.23	141.90 \pm 9.15
Zrele granule (na 100 μm^2)	44.31 \pm 4.67	19.35 \pm 5.19	76.23 \pm 5.58	30.31 \pm 2.66
Zrele/nezrele	0.08 \pm 0.15	0.04 \pm 0.02	0.53 \pm 0.30	0.09 \pm 0.12
Ukupno granula (na 100 μm^2)	194.52 \pm 14.90	331.36 \pm 44.55	176.37 \pm 8.28	172.20 \pm 9.95
Prosečna površina granule (μm^2)	0.029 \pm 0.001	0.028 \pm 0.001	0.045 \pm 0.002	0.035 \pm 0.002

Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da na razlike između grupa u pogledu svih analiziranih parametra utiču i ishrana obogaćena saharozom i tretman metimazolom (Tabela 37). Nezrele, kao i sve prisutne granule po jediničnoj površini citoplazme β -ćelije statistički su znatno brojnije u grupi tretiranoj metimazolom u odnosu na sve druge grupe životinja (Tabele 36, 38 i 41). Ishrana obogaćena saharozom značajno povećava, u odnosu na sve druge grupe životinja, broj zrelih granula po jedinici površine, dok tretman metimazolom (M i MS grupe) utiče na smanjenje broja zrelih granula u odnosu na kontrolnu grupu, sa statističkom značajnošću samo za M grupu (Tabele 36 i 39). Na odnos zrelih naspram nezrelih granula najveći uticaj ima ishrana obogaćena saharozom, i to tako što se pod ovim eksperimentalnim uslovima povećava indeks zrele/nezrele granule u poređenju sa svim drugim grupama životinja (Tabela 36 i 40). Površina preseka insulinskog tamnog jezgra pod većim je uticajem ishrane obogaćene saharozom. Naime, obe grupe koje su unosile saharozu (S i MS) imale su veću površinu tamnog proteinskog jezgra, premda je značajno povećanje

utvrđeno za S grupu u odnosu na sve druge grupe životinja i za MS grupu u odnosu na grupu koja je tretirana samo metimazolom (Tabela 36 i 42).

Tabela 37. Univarijantna dvofaktorska analiza varijanse (faktori su metimazol i saharoza) analiziranih parametara granula β -ćelija. F – vrednost F testa; p – statistička značajnost. Vrednosti $p < 0.05$ bold.

	Metimazol		Saharoza		M*S	
	F	p	F	p	F	p
Nezrele granule (na 100 μm^2)	29.7466	0.0000	34.8006	0.0000	10.3441	0.0022
Zrele granule (na 100 μm^2)	53.3495	0.0000	19.5139	0.0000	4.6676	0.0354
Zrele/nezrele	27.3490	0.0000	18.8765	0.0000	5.5921	0.0219
Ukupno granula (na 100 μm^2)	10.4002	0.0022	18.5742	0.0000	11.7478	0.0012
Prosečna površina granule (μm^2)	9.183	0.0040	48.025	0.0000	6.872	0.0118

Tabela 38. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse nezrelih granula (na 100 μm^2) za četiri grupe

Nezrele granule (na 100 μm^2)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0000			
S	0.3132	0.0000		
MS	1.0000	0.0000	0.5797	

Tabela 39. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse zrelih granula (na 100 μm^2) za četiri grupe

Zrele granule (na 100 μm^2)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0073			
S	0.0001	0.0000		
MS	0.2756	0.7944	0.0000	

Tabela 40. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse odnosa zrelih prema nezrelim granulama za četiri grupe

Indeks zrele/nezrele granule				
	K	M	S	MS
K				
M	0.3714			
S	0.0000	0.0000		
MS	1.0000	1.0000	0.0000	

Tabela 41. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse ukupnog broja granula (na 100 μm^2) za četiri grupe

Ukupno granula (na 100 μm^2)				
	K	M	S	MS
K				
M	0.0003			
S	1.0000	0.0000		
MS	1.0000	0.0000	1.0000	

Tabela 42. Bonferoni korigovana statistička značajnost analize varijanse prosečne površine profila elektron-gustog dela granule (μm^2) za četiri grupe

Prosečna površina granule (μm^2)				
	K	M	S	MS
K				
M	1.0000			
S	0.0000	0.0000		
MS	0.0928	0.0052	0.0005	

5. DISKUSIJA

Analiza uslova eksperimenta

U cilju ispitivanja uticaja ishrane obogaćene ugljenim hidratima na morfo-funkcionalne karakteristike egzokrinog i endokrinog pankreasa pacova u uslovima sistemskog hipotireoidizma korišćen je eksperimentalni model u kome je hipotireoidizam izazvan upotrebom 0.02 % rastvora metimazola u vodi za piće, tokom tri nedelje. Tretman ovim antitireoidnim agensom često se primenjuje u humanoj i veterinarskoj medicini za lečenje hipertireoidizma, a u različitim koncentracijama u trajanju od dve do četiri nedelje konvencionalno se koristi za eksperimentalno uspostavljanje hipotireoidnog stanja (Cooper et al. 1984, Burmeister et al. 1997, Chehade et al. 1999, Petrovic et al. 2001).

Iz literature su poznati različiti eksperimentalni modeli u kojima se laboratorijske životinje izlažu povećanom unosu ugljenih hidrata ponuđenih u vidu ishrane sa velikim udelom saharoze, rastvora saharoze u vodi za piće ili infuzije rastvora glukoze visoke koncentracije (Koko et al. 1988, Del Zotto et al. 1999, Camihort et al. 2000, Del Zotto et al. 2002, Lipsett and Finegood 2002). Dijeta koja uz standardnu laboratorijsku hranu podrazumeva i unos 10% rastvora saharoze u vodi za piće, korišćena u ovoj tezi, najbolje odražava način ishrane ljudi u najrazvijenim zemljama zapadnog sveta (Del Zotto et al. 1999).

Na osnovu iskustava iz laboratorijske prakse zna se da metimazol daje vodi neprijatan ukus, pa je životinje nerado piju. Da bi se precizno utvrdila količina unetog antitireoidnog agensa, praćen je dnevni unos tečnosti. Kod obe grupe tretirane metimazolom (M i MS) unos tečnosti bio je smanjen (u proseku nešto preko 30 ml/24h, u poređenju sa 42 ml/24h u kontrolnoj grupi). Pri primenjenoj koncentraciji od 0.02%, životinje su dnevno u proseku unosile oko 6 mg metimazola.

Da li je ova količina metimazola bila dovoljna za uspostavljanje hipotireoidnog stanja procenjivano je merenjem koncentracija T3 i T4 u serumu tretiranih pacova i upoređivanjem sa vrednostima u kontrolnoj grupi. U praksi, ovakav pristup otežan je činjenicom da postoje velike individualne varijacije nivoa tireoidnih hormona, što potvrđuju i rezultati ove studije. Vrednosti T3 hormona u kontrolnoj grupi životinja

kreću se u rasponu od 0.8-1.5 nmol/l, a T4 od 79-99 nmol/l. U metimazolom tretiranim životinjama M i MS grupe dolazi do sniženja nivoa oba hormona u serumu, i to preko 20% za T3 i čak preko 95% za T4. Primenom Bonferoni testa za utvrđivanje značajnosti dobijenih razlika, statistički značajno sniženje potvrđeno je za nivo T4 hormona u obe metimazolom tretirane grupe životinja, ali ne i za T3 hormon. Međutim ukoliko bi se dobijene vrednosti analizirale manje strogim statističkim testovima poput Studentovog *t*-testa, potvrđuje se statističko značajno sniženje i za T3 hormon. Takođe treba pomenuti da postoje literaturni podaci o izraženijem spuštanju nivoa hormona štitne žlezde u krvotoku (Blennemann et al. 1992, Chegade et al. 1999), pa bi se hipotireoidizam uspostavljen u ovom eksperimentu mogao okarakterisati kao umeren.

Životinje koje su pile rastvor saharoze unosile su skoro duplo više tečnosti od kontrolne grupe (80 ml/24h), zbog njenog prijatnog ukusa.

Eksperimentalne životinje hranjene su standardnom briketiranom laboratorijskom hranom za pacove. Praćenjem njene potrošnje utvrđeno je da su sve eksperimentalne grupe životinja imale manji prosečni dnevni unos hrane od kontrolnih. Podaci iz literature ukazuju na 25% manji unos hrane životinja u sličnom modelu hipotireoidizma (Venditti et al. 2003), što je u skladu sa smanjenjem od 20% i 28% u našim M i MS grupama.

Sagledavši zajedno količinu unete tečnosti i hrane, mogao se preračunati prosečan ukupan dnevni energetska unos. Tako je pokazano da je u uslovima umerenog hipotireoidizma indukovano metimazolom, ukupni energetska unos smanjen što se može tumačiti sniženjem stope bazalnog metabolizma. U S grupi, manji energetska unos u vidu čvrste hrane ne samo da je nadoknađen nego je i prevaziđen unosom velike količine rastvora saharoze. U grupi hipotireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze, ukupan energetska unos je nešto veći nego u M grupi, ali još uvek ispod kontrolnih vrednosti. Prema tome, može se zaključiti da su smanjeni energetska zahtevi u sklopu opšteg sniženja stope metabolizma prevagnuli nad povećanim voljnim unosom rastvora saharoze.

Uticaj eksperimentalnih uslova na masu životinja i masu pankreasa

Literaturni podaci koji razmatraju promenu telesne mase laboratorijskih pacova u eksperimentalnom hipotireoidizmu prilično su neusaglašeni što je najverovatnije rezultat različite starosti eksperimentalnih životinja, jačine postignutog hipotireoidizma, ali i variranja ostalih uslova eksperimenta. Ipak najbrojniji su podaci koji govore u prilog smanjenog prirasta hipotireoidnih životinja u odnosu na kontrolne (Burmeister et al. 1997, Chegade et al. 1999, LeGrow et al. 1999). U ovom radu, najupečatljiviji efekat sistemskog hipotireoidizma na nivou organizma jeste značajno smanjenje prinosa telesne mase životinja tretiranih metimazolom u odnosu na kontrolu, koje u obe grupe iznosi oko 40%.

Poznato je da nedostatak tireoidnih hormona negativno utiče na sve metaboličke procese u telu, pokazujući veoma jak uticaj na sintezu proteina (Tata et al. 1963, Tapley 1964). Tireoidni hormoni takođe stimulišu sekreciju hormona rasta iz hipofize (Barrett 2003), pa se usporeni rast bar delimično može objasniti i deficijencijom hormona rasta. U isto vreme zbog smanjene potrošnje energije opali su i zahtevi za unosom hrane, što je sve zajedno dovelo do smanjenog prirasta telesne mase uočenom u ovoj studiji. Slabije napredovanje životinja M i MS grupe još je jedna potvrda uspostavljenog sistemskog hipotireoidizma u ovim grupama.

Izostanak značajne promene telesne mase životinja prehranjivanih saharozom, u odnosu na kontrolu, što je inače i ranije objavljivano u radovima drugih autora (Koko et al. 1988, Del Zotto et al. 1999), može se tumačiti stanjem relativne gojaznosti (Laube et al. 1976). Naime, zbog preferencijalne konverzije saharoze u masne depoe, uvećavaju se depoi belog masnog tkiva u abdominalnoj duplji ali i u celom telu, pri čemu izostaje upečatljivo povećanje telesne mase (Macdonald and Roberts 1965, Marshall et al. 1968, Brook and Noel 1969). U našem eksperimentu, na većem broju svetlosno-mikroskopskih preparata životinja koje su unosile saharozu, nezavisno od tireoidnog statusa, uočeno je povećano prisustvo belih adipocita u vezivnom tkivu unutar pankreasa, ali i u samom parenhimu, što se može povezati sa pomenutim promenama u metabolizmu saharoze. Iako u ovoj tezi nisu specifično ispitivani abdominalni i retroperitonealni depoi masnog tkiva, prisustvo belih adipocita u samom pankreasu u skladu je sa navedenim literaturnim podacima.

Apsolutna masa i volumen pankreasa u obe grupe životinja tretiranih metimazolom bili su značajno manji nego u kontrolnoj grupi. Pošto nije ustanovljena promena relativne mase pankreasa u ovim grupama, može se zaključiti da je manja apsolutna masa pankreasa odraz manjeg prirasta telesne mase, tj. usporenog rasta hipotireoidnih životinja. Izostanak promena volumenskih gustina pojedinih strukturnih konstituenata egzokrinog pankreasa, kao i volumenske gustine, broja i mase Langerhansovih ostrvaca ukazuju na srazmerno usporavanje rasta endokrine i egzokrine komponente pankreasa. Eutireoidne životinje koje su unosile rastvor saharoze imale su smanjenu apsolutnu i relativnu masu pankreasa. Ni u ovoj grupi nisu zabeležene promene stereoloških parametara egzokrine i endokrine komponente, pa zaključujemo da su se promene odvijale sinhronizovano unutar egzokrine i endokrine komponente. Na nivou elektronske mikroskopije, na površini acinusnih i β -endokrinih ćelija često je bilo moguće uočiti "omega" figure koje ukazuju na odvijanje procesa egzocitoze. Stoga se smanjenje mase pankreasa može objasniti s jedne strane povećanjem količine belog masnog tkiva koje ima manju specifičnu težinu i degranulacijom sekretnih ćelija, a sa druge blagim, mada ne statistički značajno povećanim prinosom telesne mase životinja iz ove grupe.

Uticaj eksperimentalnih uslova na vrednosti biohemijskih parametara u serumu

U ovom radu, ni u jednoj grupi nije registrovana promena u koncentraciji glukoze u krvi, premda se zapaža blagi trend smanjenja u obe grupe hipotireoidnih pacova, što se može povezati sa manjim unosom hrane životinja ovih grupa. Izostanak povećanja nivoa glukoze u S grupi ukazuje na to da je pod datim eksperimentalnim uslovima endokrini pankreas uspešno održao homeostazu glukoze. Ovaj rezultat u skladu je sa ranije publikovanim podatkom da se nivo glukoze u cirkulaciji pacova hranjenih saharozom održava u fiziološkim granicama (Laube et al. 1976), a da do disbalansa u glukoregulaciji dolazi tek pri dugotrajnijem unosu saharoze (Lombardo et al. 1996).

U ovoj studiji, ni u jednoj od eksperimentalnih grupa nije došlo do značajne promene nivoa insulina u cirkulaciji, uprkos tome što se zna da ishrana obogaćena

ugljenim hidratima deluje stimulatивно na njegovu biosintezu i sekreciju (Lin et al. 1972, Karam et al. 1974, Del Zotto et al. 2002). U obe grupe životinja koje su unosile rastvor saharoze uočene su velike individualne varijacije u nivou ovog hormona, naročito kod hipotireoidnih životinja (u MS grupi vrednosti su se kretale od 28 do 200 mIU/l). Ova velika varijabilnost može se objasniti postojanjem funkcionalne heterogenosti β -ćelija koje se razlikuju po svom pragu osetljivosti na glukozu (Pipeleers 1992, Pipeleers et al. 1994, Karaca 2010). Individualna varijabilnost najverovatnije je odgovorna za izostanak statistički značajnih promena koncentracije insulina u serumu životinja koje su unosile saharozu.

Na osnovu gore navedenog, zaključujemo da je nivo insulina u cirkulaciji i eutireoidnih i hipotireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze, iako se ne razlikuje od onog u kontrolnoj grupi životinja, dovoljan da održi normoglikemiju u uslovima povećanog opterećenja ugljenim hidratima, tokom najmanje tri nedelje, koliko je trajao ovaj eksperiment.

U našem eksperimentu ustanovljeno je značajno sniženje koncentracije triglicerida u serumu, u obe grupe hipotireoidnih životinja, što je u skladu sa ranije publikovanim rezultatima (Rosenqvist et al. 1981) i posledica je izmenjenog metabolizma lipida u hipotireoidizmu (Dory et al. 1981), uz mogući uticaj smanjenog unosa hrane.

Biohemijska analiza pokazala je da je nivo triglicerida u serumu eutireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze ostao nepromenjen. Literaturni podaci o nivou triglicerida u krvi u uslovima prehranjivanja saharozom, različiti su, u zavisnosti od zastupljenosti saharoze u ishrani i dužine tretmana. Pored toga, zapaženo je da se pri dugotrajnim tretmanima ugljenim hidratima (preko 6 meseci) paralelno povećavaju nivoi triglicerida i glukoze (Lombardo et al. 1996, Del Zotto et al. 2002). U uslovima koji više odgovaraju našem eksperimentalnom modelu, nije zabeležena značajna promena koncentracije triglicerida i glukoze (Del Zotto et al. 1999).

Egzokrini pankreas

Oblik i broj nukleusa u acinusnim ćelijama

Većina eukariotskih ćelija poseduje jedan nukleus kod koga je nukleusnim ovojem (NO) nasledni materijal odvojen od citoplazme (Webster et al. 2009). Nukleusni ovoj sačinjen je od dve membrane (spoljašnja i unutrašnja) koje su perforirane nukleusnim porama. U nivou kompleksa nukleusne pore spoljašnja membrana NO u kontinuitetu je sa unutrašnjom membranom formirajući tako membranski deo pore. Prostor koji se nalazi između ove dve membrane označava se kao perinukleusna cisterna. Mreža proteina, nukleusna lamina, naleže na nukleoplazmatsku površinu unutrašnje membrane NO i interaguje sa hromatinom. Nukleusna lamina sačinjena je pretežno od intermedijarnih filamenata, lamina tipa A i tipa B (Dechat et al. 2008). Nukleusna lamina sadrži i proteine pridružene laminu kao i druge proteine koji su uronjeni u unutrašnju membranu NO (Wilhelmsen et al. 2006). Moguće je da nukleusna lamina ima ulogu u unutrašnjoj organizaciji nukleusa. Naime, hromozomi su u nukleusu organizovani u diskretne hromozomske teritorije (Cremer et al. 2006), a takođe je i heterohromatin, transkripciono neaktivni region hromatina, periferno pozicioniran u nukleusu (Akhtar and Gasser 2007), najverovatnije zahvaljujući nukleusnoj lamini.

Nukleusi većine ćelija su okrugli ili ovalni. Međutim oblik nukleusa može se menjati sa starošću ili sa razvojem različitih bolesti (Webster et al. 2009). Promenjen oblik nukleusa često se odražava i na funkciju određenih specijalizovanih tipova ćelija. Promena oblika nukleusa može biti posledica promena u nukleusnoj lamini, ili rezultat događaja u citoplazmi. Ni u jednom slučaju nije još sasvim razjašnjeno kako se oblik nukleusa odražava na funkciju, ali postoje dve glavne hipoteze, koje se međusobno ne isključuju. Prva hipoteza pretpostavlja da se promenom oblika nukleusa menja rigidnost nukleusa, čime se olakšava provlačenje pokretnih ćelija, na primer prilikom napuštanja krvnih sudova. Po drugoj hipotezi, promene u obliku nukleusa rezultuju reorganizacijom hromatina i time utiču na ekspresiju gena.

Izgled nukleusa acinusnih ćelija koji bi odražavao povišenu sintetsku aktivnost, zapažen je u najvećem broju ćelija u S grupi životinja. Nukleusi su bili pravilno okrugli, u njima je preovladavao euhromatin, a retikularan nukleolus nalazio se uglavnom uz

nukleusni ovoj. Svetao, euhromatski nukleus i veliki dobro definisani nukleolus odlika su metabolički aktivnih ćelija. U ćelijama koje se odlikuju brzim metabolizmom nukleolus je smešten na periferiji jedra, da bi se olakšala i ubrzala razmena između nukleusa i citoplazme (Cheville 2009).

Na nivou elektronske mikroskopije pokazano je da su nukleusi acinusnih ćelija u K, M i MS grupi često u manjoj ili većoj meri bili nazubljeni. Nešto veća količina heterohromatina bila je pozicionirana uz ovoj nukleusa M grupe, što bi govorilo o rearanžmanu hromatina u pravcu inaktiviranja transkripcije. U isto vreme uočene su brojne dvojedarne acinusne ćelije, naročito u eksperimentalnim grupama. U obe hipotireoidne grupe nukleusi binukleusnih ćelija su približeni i “uklopljeni” jedan uz drugi, čime se smanjuje površina nukleusnog ovoja slobodna za nukleocitoplazmatske razmene, što bi upućivalo na manju aktivnost ovih nukleusa. Isti oblik i međusobna pozicija nukleusa acinusnih ćelija uočena je i kod pankreasa pacova tretiranih simvastatinom za koji je dokazano da negativno deluje na morfo-funkcionalne odlike pankreasa i potencijalno izaziva pankreatitis (El-Bakary and Mousa 2008). Nukleusi binukleusnih ćelija eutireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze po pravilu su udaljeni jedan od drugog, što sugeriše da se nukleocitoplazmatske razmene odvijaju slobodno i intenzivno. Prema tome, na osnovu morfološke analize na ultrastrukturnom nivou može se zaključiti da je egzokrini pankreas pacova iz S grupe bio u stanju veće funkcionalne aktivnosti u odnosu na ostale grupe u eksperimentu.

Prema podacima iz literature od ranije je poznato da se kod normalnog pankreasa pacova javlja dvojedarnost acinusnih ćelija. Procentualna zastupljenost dvojedarnih ćelija varira od oko 30-80%, ponekad u zavisnosti i od sastava ishrane pacova (Dolley 1925, Bourdel et al. 1971, Morgan et al. 1986). Značaj ovakvog otkrića nije u potpunosti rasvetljen, premda postoje viđenja po kojima se dvojedarne acinusne ćelije često uočavaju pošto su otpornije na autolizu i oštećenja od jednojedarnih ćelija, pa im je životni vek duži (Ogata et al. 2011). Morgan i saradnici (1986) ne isključuju ni mogućnost da su jednojedarne acinusne ćelije u normalnom pankreasu zapravo rezervoar, pul ćelija koje zadržavaju sposobnost deobe, dok su dvojedarne acinusne ćelije terminalno diferencirane, potpuno posvećene svojoj fiziološkoj funkciji.

Kod drugih tipova ćelija, npr. hepatocita i srčanih mišićnih ćelija, dvojedarnost se razmatra kao prolazna faza koja vodi ka poliploidiji (Alfert and Geschwind 1958, Carriere 1967, Epstein and Gatens 1967, Fischman 1979, Guidotti et al. 2003). Poliploidizacija, kao univerzalan fiziološki proces (Ravid et al. 2002) ukazuje na terminalnu diferencijaciju ćelija sisara (Sigal et al. 1999), pa stoga predstavlja generalnu strategiju ćelijskog rasta koja omogućava povećanje metaboličke produktivnosti i može biti alternativa ćelijskoj deobi (Ravid et al. 2002). Na osnovu rada koji su publikovali Nagata i Ma (2004) poznato je da su dvojedarne ćelije pokazatelji hipertrofije i pojačane sintetske aktivnosti, pošto je više nasintetisanih proteina prisutno u citoplazmi dvojedarnih u odnosu na jednojedarne ćelije. Prisustvo većeg broja dvojedarnih acinusnih ćelija u pankreasu eutireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze, dalje podržava pretpostavku o njihovoj povećanoj aktivnosti.

Granulisani endoplazmin retikulum (gER) u acinusnim ćelijama

Acinusne ćelije egzokrinog pankreasa posvećene su sintezi i sekreciji digestivnih enzima, koja se odvija na gER-u i pod kontrolom je hormona, neurotransmitera i faktora rasta (Williams 2006). Pored toga, brzina sinteze i enzimski sastav pankreasnog soka prilagođavaju se relativnoj zastupljenosti pojedinih hranljivih materija u dijeti (Ben Abelilil et al. 1963, Howard and Yudkin 1963, Johnson et al. 1977, Bourdel 1983, Schick et al. 1984, Sabb et al. 1986, Wicker and Puigserver 1987, Walkowiak et al. 2007).

Granulisani ER je organela koja se odlikuje velikom površinom i distribucijom po čitavoj acinusnoj ćeliji. Velika količina membrana koje zatvaraju cisternu, organizuje se u lamelarne strukture čime nastaje kompleksna arhitektura koja varira u zavisnosti od funkcionalnih potreba. Varijacije u organizaciji gER-a ne postoje samo među različitim tipovima ćelija, već i u različitim domenima iste ćelije. Naime iako je gER jedinstvena kontinuirana organela (Baumann and Walz 2001, Snapp 2004), sastavljen je od strukturno i funkcionalno specifičnih podregiona. Izgleda da su mnogi od njih u konstantnom stanju fluksa (Snapp 2004), što sugeriše da gER ima izuzetnu fleksibilnost

u menjanju strukturne organizacije koja se može prilagođavati neprekidnim promenama zahteva ćelije (Borgese et al. 2006).

U pojedinim acinusnim ćelijama hipotireoidnih pacova primetili smo akumulacije koncentrično postavljenih paralelnih membrana grER-a. Ovakve formacije gER-a primećene su i ranije u različitim ćelijama, u fiziološkim i patološkim stanjima. Značaj koncentrično namotanih membrana gER-a još nije u potpunosti razjašnjen. Njihova pojava povezuje se sa procesima formiranja i/ili regeneracije endoplazminog retikuluma (Jordan 1964), ili sa odgovorom acinusnih ćelija na unos hrane (Fawcett 1961). Sa druge strane, prisustvo namotanih membrana gER-a primećeno je u sklopu degenerativnih procesa u ćelijama (Emmelot and Benedetti 1960) i, posebno, atrofije egzokrinog pankreasa (Hashimoto et al. 1979, Pfister et al. 1980).

S obzirom na to da je prisustvo opisanih formacija sačinjenih od gER-a bilo naglašeno u acinusnim ćelijama hipotireoidnih životinja koje su unosile manje hrane i zaostajale u rastu, verujemo da se ono pre može pripisati atrofičnim promenama.

Granulisani endoplazmin retikulum predstavlja prvu stepenicu na sekretnom putu proteina (Ron and Walter 2007). Većina novosintetisanih sekretnih i transmembranskih proteina u vidu nesavijenih polipeptidnih lanaca translocira se u lumen gER-a, gde se nalaze šaperoni i enzimi za nabiranje, čijom aktivnošću proteini zadobijaju trodimenzionalnu strukturu, u sredini koja je bogata Ca^{2+} jonima (nabiranje proteina je zavisno od Ca^{2+} jona). Nascentni proteini mogu biti glikozilovani i savijeni u tercijarnu strukturu koja se stabilizuje uspostavljanjem disulfidnih veza uz pomoć disulfidnih izomeraza. Zreli proteini koji prođu kontrolu kvaliteta eksportuju se u Goldži kompleks, dok se pogrešno savijeni proteini obeležavaju za „degradaciju povezanu sa gER-om“, što podrazumeva translociranje u citoplazmu i degradaciju proteazomima. Međutim pod uslovima pri kojima reparatorni mehanizmi ne mogu da odgovore na povećane zahteve, ovi proteini agregiraju u lumenu gER-a i ne mogu se translocirati u citoplazmu, pa cisterne postaju proširene (Pavelka and Roth 2005b).

U ovoj tezi, cisterne gER-a dilatirane u različitoj meri, zapažene su u pojedinačnim ćelijama obe grupe koje su unosile ishranu obogaćenu saharozom. U S grupi blago dilatirani gER je vidljiv uglavnom u bazalnom regionu ćelija. Ovakva

morfologija najverovatnije odgovara fiziološkoj adaptaciji ćelije, a ne postojanju nekog patološkog procesa, tim pre što ni druge subćelijske komponente ne pokazuju znake oštećenja. Povećani energetska unos u S grupi, kao posledica povećanog unosa saharoze ne može se direktno povezati sa povećanim zahtevom za pankreasnim digestivnim enzimima, koji bi mogao dovesti do umerene dilatacije gER-a, s obzirom na to da se saharoza, kao preovlađujuća hranljiva komponenta, razlaže u tankom crevu zahvaljujući saharazi koja se nalazi u nivou mikrovesica enterocita, a ne uz pomoć pankreasnih enzima (Gray 1971).

Nasuprot tome, u MS grupi proširene cisterne su izraženije i ponekad je citoplazma čitave acinusne ćelije „zaposednuta“ dilatiranim gER-om, što je slika koja odgovara promenama zapaženim u odmakloj subkliničkoj fazi insuficijencije egzokrinog pankreasa (Wiberg et al. 1999). Proširene cisterne gER-a uočavaju se kada je narušen balans između zahteva ćelije za funkcijom gER-a i njegovog kapaciteta i obeležje je stresa gER-a (Schroder and Kaufman 2005). Narušena homeostaza gER-a aktivira odgovor na stres, takođe poznat kao „odgovor na nesavijene proteine“ (Ron and Walter 2007). Ovaj odgovor je mehanizam adaptacije, naročito bitan kod sekretnih ćelija, i služi da se dinamički proširi i veličina i kapacitet gER-a u skladu sa funkcionalnim zahtevima postavljenim pred sekretni put. Ćelija se na stres gER-a adaptira tako što težište svoje funkcije sa sinteze sekretnih proteina prebacuje na transkripciju komponenti gER mašinerije koja je uključena u savijanje, glikozilaciju, „degradaciju povezanu sa gER-om“, proverom kvaliteta i sl. Osnovni cilj „odgovora na nesavijene proteine“ je da se gER rastereti nesavijenih proteina, adaptira na funkcionalne zahteve i da se povrati homeostaza organele (Rutkowski and Hegde 2010). Međutim ako se ne uspostavi homeostaza gER-a, produženi „odgovor na nesavijene proteine“ može indukovati apoptozu (Zhao and Ackerman 2006, Cnop et al. 2012). Stres gER-a mogu uzrokovati i patološka stanja, ali i nedovoljna količina šaperona ili neadekvatna koncentracija Ca^{2+} jona (Cnop et al. 2012).

U MS grupi u bazalnom regionu pojedinih acinusnih ćelija, uz gER, uočene su vezikule u čijoj unutrašnjosti je uglavnom bio prisutan tamni materijal. Radi se zapravo o lokalnim dilatacijama cisterne gER-a, koje morfološki odgovaraju mikrovezikulama gER-a uočenim npr. kod alkoholizmom indukovane pankreasne fibroze kod ljudi

(Kuroda et al. 2007). Vezikulacija gER-a, zajedno sa gore opisanom dilatacijom cisterni, smatra se manifestacijom njegove uznapredovale degeneracije (Kuroda et al. 2007). Abnormalnosti u gER-u, Goldži kompleksu, lizozomima i zimogenim granulama doprinose poremećaju u unutarćelijskom transportu niza sekretiranih proteina i imaju važnu ulogu u periacinusnoj kolagenizaciji (Kuroda et al. 2007).

Na osnovu navedenog, mislimo da ćelije egzokrinog pankreasa hipotireoidnih životinja pokušavaju i u najvećem broju uspevaju da se morfo-funkcionalno prilagode izmenjenom režimu ishrane. Ipak, ultrastruktura pojedinih ćelija podleže ozbiljnijim patološkim promenama koje ih mogu odvesti ka ćelijskoj smrti. Ukoliko bi se delovanje eksperimentalnih faktora produžilo mogla bi se očekivati dalja i sve izraženija oštećenja egzokrine komponente organa.

Zimogene granule

Posle sinteze na gER-u, obrade i koncentrisanja u Goldži kompleksu, digestivni enzimi prvo se pakuju u kondenzacione vakuole, formu nezrelih granula koje zatim sazrevaju u zimogene granule. Kondenzacione vakuole odvajaju se od trans-Goldži cisterne i nalaze se na trans strani Goldži kompleksa. Kako su na elektronskim mikrofotografijama pankreasa samo jedne životinje (M grupe) uočeni profili trans-Goldži mreže, moguće da je to razlog zašto se nisu uočavale nezrele granule.

U zimogenim granulama nalaze se proenzimi, neaktivne forme meševine dvadesetak digestivnih enzima (Rinderknecht 1993, Scheele 1993), koji će se adekvatno obraditi i aktivirati po dospeću u duodenum. Količina i sastav digestivnih enzima u digestivnom traktu regulišu se na nivou biosinteze i sekrecije. Ranija istraživanja utvrdila su da kompozicija unete hrane reguliše mešavinu digestivnih enzima prvenstveno na transkripcionom nivou (Williams 2006). Noviji radovi pokazuju da supstance koje stimulišu sekreciju pankreasa, sekretagoge, mogu da regulišu sintezu pankreasnih proteina i na translacionom nivou (Sans and Williams 2002), pa i da dovedu do hipertrofije pankreasa (Williams 2006).

Sekretne granule funkcionišu kao kompartmenti za skladištenje sekretnih produkata i glavne su organele uključene u regulisanu sekreciju. Egzocitotsko pražnjenje granula odvija se pod precizno definisanim lokalnim uslovima, posle neuralne stimulacije ili stimulacije gastrointestinalnim hormonima (Pavelka and Roth 2005c). Oslobođanje proenzima dešava se posle unosa hrane i indukovano je vezivanjem holecistokinina za receptore na bazolateralnim stranama ćelijske membrane acinusnih ćelija (Pavelka and Roth 2005a). Direktan okidač za egzocitozu zimogenih granula sa apikalnog dela ćelijske membrane u lumen acinusa je porast koncentracije Ca^{2+} jona (Williams 2006).

U pankreasu pacova postoje dve populacije zimogenih granula: oko 5% svih granula su granule većih dimenzija, dok veću populaciju čine granule manjih veličina (de Dios et al. 1995). Međutim veličina i brojnost zimogenih granula mogu se povećati u određenim uslovima, kao što je primećeno u pankreatitisu kod ljudi (Helin et al. 1980), što ovi autori tumače kao povećanu aktivnost enzima zimogenih granula. Takođe tokom mitoze acinusnih ćelija uočeno je povećanje broja manjih granula, što bi možda bio odraz menjanja težišta sa funkcije transporta digestivnih enzima na funkciju rezervoara membrana za obnovu sakula Goldži kompleksa tokom telofaze ili čak za formiranje ćelijske membrane između ćerki ćelija (Melmed et al. 1973).

Iako nismo detaljno analizirali veličinu i brojnost zimogenih granula, stekli smo utisak da su se ovi parametri menjali u zavisnosti od eksperimentalnih tretmana. Eutireoidne životinje koje su unosile saharozu, imale su naizgled manji broj zimogenih granula, koje su delovale sitnije. Nasuprot tome, u obe hipotireoidne grupe citoplazma acinusnih ćelija bila je ispunjena preovlađujuće krupnim zimogenim granulama.

U fiziološkim uslovima brojnost zimogenih granula varira u zavisnosti od faze sekrecije: brojne su kod životinja koje gladuju, a malo ih ima neposredno posle obroka (Bloom and Fawcett 1968). Nešto noviji podaci pokazuju da se nakon infuzije holecistokininom, veličina granula u acinusnim ćelijama pacova smanjuje, odnosno da holecistokinin indukuje pražnjenje većih granula (de Dios et al. 1999). Pošto je energetska unos u hipotireoidnim grupama manji nego kod kontrolnih životinja, manje je i izbacivanje sadržaja granula većih dimenzija pa one čine dominantne granule u citoplazmi acinusnih ćelija. Na osnovu arbitrarne procene zastupljenosti granula različitih

dimenzija u acinusnim ćelijama pankreasa eutireoidnih i hipotireoidnih pacova hranjenih normalno ili prehranjivanih saharozom zaključujemo da je oslobađanje pankreasnih enzima kod hipotireoidnih životinja smanjeno. Ovi rezultati u skladu su sa rezultatima ranije publikovanih studija koje su se bavile morfološkim aspektima regulacije sekrecije acinusnih ćelija (Ermak and Rothman 1981, Beaudoin et al. 1984, Aughsteen and Cope 1987, de Dios et al. 1999).

U kontekstu ranije pomenute činjenice da se saharoza, kao glavni hranljivi sastojak koji unose eutireoidni pacovi prehranjivani saharozom, razlaže saharozom lokalizovanom u nivou apikalne membrane crevnih epitelnih ćelija, dakle praktično nezavisno od pankreasnih digestivnih enzima, a da je unos standardne hrane manji nego kod kontrolnih životinja, postavlja se pitanje zašto morfologija acinusnih ćelija u ovoj grupi odgovara sintetski i sekretno aktivnim ćelijama. Moguće je da je mehaničko prisustvo sadržaja, čvrste hrane i/ili tečnosti, u gornjim delovima digestivnog trakta, pre svega u želucu, dovoljno da posredstvom gastrina stimuliše sekreciju digestivnih enzima egzokrinog pankreasa (Scemama et al. 1987, Le Drean et al. 1999).

U bazolateralnom regionu velikog broja acinusnih ćelija životinja S grupe, zapazili smo klastere vakuolama-sličnih organela, čije dimenzije odgovaraju dimenzijama zimogenih granula. Obično su kompletno prosvetljene, naizgled prazne, premda se ponekad u njima uočava (eks)centričan taman sadržaj. Kod pacova tretiranih simvastatinom ovakve strukture identifikovane su kao bazalno locirane zimogene granule u kojima je došlo do gubitka elektron-gustine i/ili delimičnog razlaganja sadržaja na periferiji granula (El-Bakary and Mousa 2008). Egzocitoza zimogenih granula uobičajeno se obavlja preko apikalne membrane, dok se rezidualna tela i nefunkcionalne zimogene granule izbacuju preko bazolateralnih delova membrane (Kuroda et al. 1998). Verujemo da u našem eksperimentu organele slične vakuolama uočene u bazalnom regionu nekih ćelija predstavljaju izmenjene zimogene granule čiji enzimski sastav ne odgovara specifičnom načinu ishrane životinja iz ove grupe. Izučavanjem patologije pankreasa na različitim eksperimentalnim modelima pokazano je da, kao rezultat preusmeravanja egzocitoze zimogenih granula ka intersticijumu, dolazi do ektopične aktivacije pankreasnih enzima i pankreatitisa (Gaisano et al. 2001, Cosen-Binker et al. 2008), pri čemu se favorizuju fibroza i masna infiltracija pankreasa

(Kloppel et al. 1986, Kakinuma et al. 2007) uz smanjenje parenhimske komponente. S obzirom na to da rezultati naše stereološke, a ni morfološke analize ne ukazuju na postojanje fibroze ili bilo kakvih destruktivnih promena egzokrinog parenhima, zaključujemo da bazolateralna egzocitoza nema značajnijeg negativnog efekta na histološku strukturu pankreasa, verovatno zbog izmenjene aktivnosti digestivnih enzima koji tim putem napuštaju ćeliju.

Vakuolizacija u acinusnim ćelijama

U acinusnim ćelijama pankreasa zapaženo je prisustvo vakuola, čiji su se izgled, veličina i pozicija razlikovali u zavisnosti od eksperimentalnih uslova. Pod svetlosnim mikroskopom vakuole u vidu belih, nebojenih “balončića” naročito su se isticale po brojnosti u acinusnim ćelijama metimazolom tretiranih životinja. Uzorci tkiva posmatrani pod elektronskim mikroskopom pojasnili su sliku dobijenu pod svetlosnim mikroskopom. Brojne vakuole u M grupi ispunjene su tamnim amorfnim sadržajem, što upućuje da se radi o kompartmentima endozomsko-lizozomskog sistema.

Autofagija je proces koji se u bazalnim okvirima dešava u svim ćelijama (Iovanna and Vaccaro 2010). To je niz uzastopnih događaja tokom kojih ćelije razlažu proteine i ćelijske organele čije konstituente ponovo mogu da koriste u sintetskim procesima (Xie and Klionsky 2007, Levine and Kroemer 2008, Mizushima et al. 2008). U istraživanjima koja se bave proučavanjem autofagije morfološki se razlikuju dva tipa vakuola. Rane, inicijalne autofagne vakuole sadrže intaktan deo citoplazme sekvstriran za autofagiju, dok kasne, degradativne autofagne vakuole sadrže delimično razložen i neprepoznatljiv sadržaj (Eskelinen et al. 2003, Mizushima et al. 2008).

Autofagija do koje dolazi tokom gladovanja, koje je njen najjači fiziološki pokretač, može se smatrati adaptivnim odgovorom u okviru koga ćelija razlaže svoje neesencijalne komponente obezbeđujući vitalno važne gradivne blokove kao što su aminokiseline (Levine and Kroemer 2008, Mizushima et al. 2008). Organele čija je sudbina da budu degradovane prvo se izoluju u autofagozome uspostavljene dvema membranama, koji se zatim fuzionišu sa kasnim endozomima i lizozomima formirajući autolizosome uspostavljene jednom membranom. Materijal u autolizozomima razlažu

hidrolaze. Najvažnijom klasom hidrolaza može se smatrati katepsinska familija proteaza (Bohley and Seglen 1992, Ishidoh and Kominami 2002).

Akumulacija autofagnih vakuola u acinusnim ćelijama istaknuto je obeležje pankreatitisa (Helin et al. 1980, Adler et al. 1982, Aho et al. 1982, Koike et al. 1982, Brackett et al. 1983, Niederau and Grendell 1988, Mareninova et al. 2009) i do nje dolazi usled usporavanja autofagne degradacije proteina, što je, po sebi, posledica smanjene aktivnosti lizozomskih hidrolaza (Mareninova et al. 2009). U acinusnim ćelijama normalno hranjenih hipotireoidnih pacova uočili smo krupne autofagne vakuole sa delimično svarenim sadržajem. Na osnovu izgleda, najverovatnije se radi o autofagnom uklanjanju zimogenih granula iz ćelije. Po završenom razlaganju, autofagne vakuole izbacuju se iz ćelije preko bazolateralne membrane, što je u skladu sa uobičajenim načinom eliminisanja ovih organela iz ćelije (Takano et al. 1994, Kuroda et al. 1998).

Prihvaćeno je da autofagno uklanjanje zimogenih granula, zimofagija, predstavlja mehanizam kojim se ćelija štiti od potencijalne i fatalne unutarćelijske aktivacije digestivnih enzima, čiji tačni uzroci i način nastanka još uvek nisu poznati (Gorelick and Thrower 2009, Vaccaro 2012). Znatan broj opisanih autofagnih vakuola odraz je nešto sporijeg odvijanja digestije što je, dalje, u skladu sa usporenjem metaboličkih procesa u hipotireoidizmu.

Pored pojave vakuola u pankreasnim ćelijama, karakteristike pankreatitisa su i infiltracija parenhima leukocitima i fibroza, ali njih nismo primetili u egzokrinom pankreasu hipotireoidnih normalno hranjenih životinja, niti detektovali kvantitativnim, stereološkim metodima. Imunohistohemijski nismo detektovali ni prisustvo aktiviranih stelatnih ćelija pankreasa ili miofibroblasta, koje bi doprinele intenzivnijem razvoju vezivnog tkiva (Kuroda et al. 2007).

Iz svega napred navedenog možemo zaključiti da je hipotireoidizam kod normalno hranjenih pacova doveo do pokretanja mehanizama zaštite acinusnih ćelija od potencijalne autodigestije koji su se manifestovali pojavom autofagnih vakuola, a što je ujedno i inicijalni događaj uočljiv kod pankreatitisa. Pri datim uslovima eksperimenta, mehanizmi zaštite su dovoljni da sačuvaju integritet acinusnih ćelija i spreče razvoj

pankreatitisa. S obzirom na to da se pankreatitis u hipotireoidizmu pre svega vezuje za pojavu hiperlipidemije (Christopher 1997, Gan et al. 2006), moguće je da hipolipidemija ustanovljena u ovom eksperimentu ima protektivnu ulogu.

Strukture koje odgovaraju autofagnim vakuolama viđene su i u drugim eksperimentalnim grupama, ali u meri koja odgovara normalnim fiziološkim procesima uočenim u kontrolnoj grupi, što je još jedna potvrda univerzalnosti autofagnog procesa.

Endokrini pankreas

Endokrine ćelije pankreasa formiraju mikroorgane, Langerhansova ostrvca, u većem organu - egzokrinom pankreasu. Ćelije sa endokrinom funkcijom sintetišu, čuvaju i u cirkulaciju sekretuju polipeptidne signalne molekule koji se dalje krvlju transportuju do udaljenih ciljnih tkiva. Zato su endokrine žlezde dobro prokrvljene: endokrini pankreas 2-3 puta je prokrvljeniji od okolnog egzokrinog tkiva (Schaeffer et al. 2011).

Analizom preparata na kojima su imunohistohemijski obeležene β -, α -, D- i PP-ćelije potvrdili smo iz literature poznatu pravilnost u njihovoj distribuciji (Bonner-Weir et al. 1993). Istovremeno pokazali smo da ni u jednoj od eksperimentalnih grupa ta pravilnost nije narušena.

Stereološka ispitivanja Langerhansovih ostrvaca pokazala su da nema značajnih razlika između eksperimentalnih grupa životinja, kada se radi o volumenskoj i numeričkoj gustini, broju i masi ostrvaca. Jedino ostrvca MS grupe pokazuju blagu tendenciju ka povećanju broja, uz istovremeno smanjenje procentualnog učešća ostrvaca velikih dijametara u ukupnom volumenu ostrvaca ove grupe. To ukazuje na moguće povećanje broja ostrvaca deobom prethodno postojećih, kod hipotireoidnih pacova koji su unosili rastvor saharoze. Kako u literaturi postoje podaci koji pokazuju da se značajno povećanje brojnosti Langerhansovih ostrvaca pacova može očekivati nakon znatno dužih tretmana, na primer posle 30-nedeljne ishrane bogate ugljenim hidratima (Lombardo et al. 1996), verovatno da tronedeljni tretman u ovom eksperimentu nije bio dovoljan da bi se ispoljila statistička značajnost ovih događaja.

Analizom svetlosno-mikroskopskih preparata na kojima su imunohistochemijski markirane endokrine ćelije ostrvaca, stekao se utisak da eksperimentalni uslovi nisu uticali na njihovu distribuciju i zastupljenost unutar ostrvaca. Stereološka analiza ovo je i potvrdila pokazavši da je većina stereoloških parametara pojedinačnih tipova endokrinih ćelija u okviru Langerhansovih ostrvaca ostala ista. Jedina promena bila je smanjenje površine profila β -ćelija metimazolom tretiranih životinja, međutim i pored toga, njihova masa nije promenjena. Rezultati ove studije u skladu su sa ranije publikovanim nalazima da antitireoidni tretman ne utiče na morfologiju ostrvaca i ćelijsku masu (Leduque et al. 1985).

Ispitivanje prisustva i zastupljenosti u ostrvcima β -ćelija koje se nalaze u fazi ćelijskog umiranja ili u fazi proliferacije, primenom metoda bojenja propidijum jodidom, odnosno detekcijom proteina Ki67 kao proliferativnog markera, nije pokazalo postojanje bitnih razlika između grupa u našem eksperimentu. Jedino su u MS grupi odsustvovala proliferišuće ćelije, što se međutim nije odrazilo na masu β -ćelija. U isto vreme ćelije pozitivne na transkripcioni faktor PDX1 koji markira fenotipski funkcionalne β -ćelije, bile su veoma zastupljene u ovoj grupi i intenzivno su se bojile, kao i ćelije u S grupi životinja. Ovakvi rezultati ukazuju da je i pored primenjenih tretmana, populacija β -ćelija, ostajala stabilna kao što je u normalnom adultnom pankreasu (Ackermann and Gannon 2007). β -ćelije adulta, naime, spadaju u tzv. sporoobnavljajuće ćelije i odlikuju se konstantnom niskom stopom proliferacije i apoptoze. Povećanje mase β -ćelija koje prati rast čitavog organizma, pre je rezultat povećanja veličine ćelija nego njihove proliferacije (Montanya et al. 2000). Sagledavši zajedno rezultate stereoloških ispitivanja i rezultate histoloških bojenja kojima je procenjena dinamika populacije β -ćelija, može se zaključiti da se pod specifičnim eksperimentalnim uslovima u ovoj studiji endokrini pankreas ponaša kao mirujući organ, što je primećeno i pri drugim promenama metaboličkih uslova (Bonner-Weir et al. 1993).

Da li su baš sve insulin-pozitivne β -ćelije funkcionalne?

Imunohistohemijska lokalizacija insulin-pozitivnih ćelija pokazala je prisustvo ovih ćelija ne samo u centralnom regionu Langerhansovih ostrvaca, već i u okviru epitela izvodnih kanala ili njihovoj neposrednoj blizini, u svim grupama životinja. Pojedinačne ćelije pozitivne na insulin sreću se i u sklopu acinusa, što je naročito izraženo u S grupi. Moguće je da pojedinačne β -ćelije prisutne u acinusima nastaju od ćelija kanala i tada replikacija obično prethodi diferencijaciji (Beresford 1990, Rosenberg 1995). Međutim kako u ovoj tezi pozitivnost ćelija kanala na Ki67 nije promenjena u S grupi u odnosu na kontrolnu, može se zaključiti da replikacija za kojom sledi diferencijacija prekursorskih ćelija kanala nije put nastanka pojedinačnih β -ćelija u S grupi. Drugi put koji vodi ka pojavi pojedinačnih β -ćelija u acinusnom tkivu pacova jeste transdiferencijacija acinusnih ćelija u β -ćelije, kako je pokazano u eksperimentima sa kratkotrajnom infuzijom glukoze (Lipsett and Finegood 2002). Verujemo da su kod eutireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze u našem eksperimentu acinusne, ekstrainsularne β -ćelije nastale prema ovom drugom scenariju. Kako stereološkom analizom egzokrinog pankreasa nismo uočili promene volumenske gustine acinusa, povećana proliferacija acinusnih ćelija u S grupi mogla bi predstavljati način nadoknade acinusnih ćelija „izgubljenih“ transdiferencijacijom u β -ćelije.

Imunodetekcijom PDX1 proteina, koji je ključni transkripcioni faktor za razviće β -ćelija i održavanje njihovog funkcionalnog fenotipa i čije je prisustvo neophodno da bi otpočela sinteza insulina (Melloul 2004, Zhou et al. 2008), uočili smo prisustvo funkcionalnih insulin-produkujućih ćelija samo u kanalima i u Langerhansovim ostrvcima svih grupa. U grupi hipotireoidnih normalno hranjenih pacova imunopozitivnih nukleusa ima manje, a reakcija je slabija, dok je u obe grupe životinja koje su unosile rastvor saharoze situacija obrnuta. Kako PDX1 pozitivnost nije detektovana u okviru acinusa, zaključujemo da novonastale pojedinačne acinusne β -ćelije u S grupi nisu funkcionalne sa aspekta sinteze insulina. One mogu predstavljati pul rezervnih β -ćelija koje su spremne da u slučaju potrebe oslobode svoj već nasintetisani insulin (i da uporedo pokrenu njegovu dalju sintezu), ali su trenutno mirujuće jer je insulin koji se stvara u sintetski aktivnijim β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca dovoljan za održanje normoglikemije.

Iz literature je poznato da do neogeneze β -ćelija dolazi ubrzo po otpočinjanju stimulusa, npr. izlaganja organizma povećanom unosu glukoze (Lipsett and Finegood 2002), a kako su u našem eksperimentu ove ćelije prisutne i posle tronedeljnog tretmana saharozom održavanje pula pojedinačnih insulin-pozitivnih ćelija moglo bi se pripisati njihovoj dodatnoj ulozi u povećanju potencijala za ekspanziju mase β -ćelija (Lipsett and Finegood 2002), naročito tokom dužih perioda hiperglikemije (Finegood et al. 1997).

Efekat eksperimentalnih uslova na morfo-funkcionalne odlike β -ćelija Langerhansovih ostrvaca

Osnovna uloga β -ćelija je regulacija sinteze insulina, njegovo čuvanje i sekrecija (Alarcon et al. 2002, Melkman-Zehavi et al. 2011). Ekspresiju insulina precizno regulišu brojni transkripcioni aktivatori i represori koji određuju sudbinu β -ćelije aktivirajući gene kao odgovor na stimulus glukozom (Andrali et al. 2008). Transkripcioni aktivatori uključuju na primer PDX1, MafA, NeuroD, Pax6, Nkx2.2 i Nkx6.1, a transkripcioni represori gena za insulin su Hes1, Insm1/IA1, Sox6, Bhlhe22 i Crem (za pregled literature videti: Melkman-Zehavi et al. 2011). Fini balans između svih ovih faktora neophodan je kako bi došlo do efikasne sinteze insulina (Melkman-Zehavi et al. 2011).

Insulin se sintetiše u β -ćelijama kao veliki jednolančani preproprotein – preproinsulin. Sa njega se odmah po ubacivanju u gER uklanja signalna sekvenca (lider sekvenca) čime nastaje proinsulin, koji se brzo nabira u trodimenzionalnu strukturu. Vezikularnim transportom proinsulin iz gER-a dospeva do odeljaka Goldži kompleksa, koji sadrže jone cinka i kalcijuma, pa sredinski uslovi favorizuju formiranje heksamera proinsulina koji sadrže cink. Proinsulin se konvertuje u insulin kombinovanim dejstvom dve endopeptidaze i karboksipeptidazom H u klatričkim nezrelim sekretnim vezikulama trans-Goldži regiona (Pavelka and Roth 2005d). Konverzija podrazumeva da se sa svakog proinsulina u sklopu heksamera odvaja povezujući (C) peptid, koji je spajao A i B lanac proinsulina, i oslobađa u region haloa sekretne granule. Heksameri insulina u sekretnim granulama imaju tendenciju da formiraju mikrokristale koji su veoma stabilni (za pregled literature videti: Dodson and Steiner 1998).

Glukoza, kao fiziološki najrelevantnija insulinska sekretagoga, stimuliše sekreciju insulina (Campbell et al. 1982, Alarcon et al. 2002) ali i biosintezu proinsulina (uglavnom na translacionom nivou). Ukratko, glukoza mora ući u β -ćeliju (preko glukoznog transportera GLUT 2), gde kao rezultat određenih metaboličkih procesa nastaje ATP. Povećan odnos ATP-a u odnosu na ADP utiče na zatvaranje kalijumovih i otvaranje kalcijumovih kanala na ćelijskoj membrani. Ulazak kalcijuma i povećanje njegovog nivoa u citoplazmi glavni je okidač za egzocitozu insulina (Prentki et al. 1997, Alarcon et al. 2002). Po dospeću u cirkulaciju, promena pH vrednosti utiče na dezintegraciju heksamera i kristala, pa insulin cirkuliše i vezuje se za receptore u formi monomera (za pregled literature videti: Dodson and Steiner 1998).

U pankreasu zdravih, kontrolnih pacova sreću se dve populacije β -ćelija: funkcionalno zrele koje čine većinu i funkcionalno nezrele koje imaju slabu moć odgovora na glukozu (Karaca 2010). Proporcija ovih ćelija je dinamična kategorija i reflektuje sposobnost pankreasa da sekretuje insulin (Karaca et al. 2009). Sadržaj insulina u obe grupe ćelija je sličan, ali se u njima nalaze različiti nivoi iRNK za insulin što potvrđuju i nalazi da se PDX1 manje eksprimira u funkcionalno nezrelim ćelijama (Karaca 2010). Funkcionalno zrele β -ćelije imaju aktivniji metabolizam u odnosu na nezrele ćelije, i tokom "prvog poziva" glukozom, samo one sekretuju insulin (Karaca 2010). Heterogenost populacije β -ćelija koja počiva na različitim sekretnim aktivnostima pojedinih ćelija, za posledicu ima i preferencijalno oslobađanje novosintetisanog insulina. Naime, ćelije koje su aktivne u oslobađanju insulina biće aktivne i u njenoj sintezi, pošto je prag nivoa glukoze za biosintezu proinsulina niži nego za sekreciju insulina (Rhodes 2000), čime će se uz pre-formirani hormon oslobađati i novosintetisani (Van Schravendijk et al. 1992).

U citoplazmi β -ćelija svih ispitivanih grupa životinja najuočljivije organele su euhromatski nukleus i brojne sekretne granule koje su najmarkantnija morfološka odlika ovih ćelija. Ponekad se na snimcima β -ćelija uočavaju gER i Goldži kompleks.

Iako je prisutna relativna stabilnost populacije β -ćelija, rezultati stereoloških ispitivanja u M grupi ukazuju na usporavanje procesa sinteze i oslobađanja insulina. U ovoj grupi detektovan je najveći broj granula po jediničnoj površini, što uz istovremeno odsustvo egzocitotskih profila sugeruje smanjenje sekrecije insulina. Takođe u M grupi

preovlađuju nezrele granule sa okruglastim tamnim jezgrom, što je dokaz ometenih kasnijih faza biosinteze insulina. Uzrok ovih procesa najverovatnije je deficijencija T3 hormona kao posledica tretmana metimazolom. Naime, poznato je da T3 pozitivno reguliše ekspresiju transkripcionog faktora PDX1, a on direktno pozitivno kontroliše ekspresiju gena za insulin (Campbell and Macfarlane 2002, Andrali et al. 2008). Izrazito smanjenje broja PDX1-pozitivnih ćelija koje je uočeno na nivou svetlosne mikroskopije u M grupi, takođe je u skladu sa ovakvim načinom regulacije.

U kontekstu manjeg prisustva zrelih insulinskih ćelija u grupi normalno hranjenih hipotireoidnih pacova, treba pomenuti da je u ovoj grupi zapaženo prisustvo ćelija koje po većini parametara odgovaraju glukagon-produkujućim α -ćelijama, ali u svojoj citoplazmi, pored glukagonskih imaju i granule koje morfološki odgovaraju granulama β -ćelija. Iz literature je poznato da u pankreasu postoje ćelije koje imaju sposobnost da ko-eksprimiraju insulin i glukagon (Movassat et al. 1997, Chung and Levine 2010, Chung et al. 2010). Pored toga zna se da tireoidni hormoni pozitivno regulišu nivo insulina u cirkulaciji (Dimitriadis et al. 1985), dok najveći broj do sada publikovanih podataka svedoči o smanjenoj koncentraciji insulina u krvi u hipotireoidizmu, zbog negativne regulacije sekrecije insulina (Katsilambros et al. 1972, Lenzen and Bailey 1984, Cortizo et al. 1985, Gomez Dumm et al. 1985, Ramos et al. 1998, 2001). Moguće je da ćelije koje ko-eksprimiraju insulin i glukagon u hipotireoidnim životinjama donekle kompenzuju deficit sintetsko-sekretne aktivnosti β -ćelija. Izostanak značajnog sniženja koncentracije insulina u serumu hipotireoidnih pacova može se objasniti dodatnom količinom insulina koji potiče iz ovih ćelija.

U endokrinom pankreasu hipotireoidnih životinja primećena je manja populacija β -ćelija "šupljikavog" izgleda koje su i ranije opisane (Gomez Dumm et al. 1985). Izgled ovih ćelija, potiče od znatno šireg haloa oko srži granule nego što je to obično slučaj. Uz granule, ponekad se uočavalo prisustvo gusto napakovanih bleđe kontrastiranih, nezrelih granula, što potvrđuje da su te ćelije aktivne u sintezi insulina (Camihort et al. 2000). U ovim sintetski aktivnim ćelijama obično su bile vidljive dilatirane cisterne gER-a, ispunjene svetlim elektron-gustim materijalom, i proširene sakule Goldži kompleksa. Ovakva morfologija sintetskih organela upućuje na zaključak da je došlo do zastoja u sintezi/obradi proteina na nivou gER-a i Goldži kompleksa.

Može se pretpostaviti da zbog usporenog metabolizma sa jedne strane i malog broja sintetski aktivnih ćelija sa druge, dolazi do funkcionalnog opterećenja gER-a i nešto sporije obrade insulina unutar njegove cisterne. Prisustvo nezrelih granula pri deficijenciji tireoidnih hormona, osim zastoja u stvaranju insulina, ukazuje i na narušen proces sekrecije, što je u skladu sa podacima iz literature (Pipeleers et al. 1994).

Iako u ovom eksperimentu nisu utvrđene promene većine stereoloških parametara vezanih za Langerhansova ostrvca, u grupi hipotireoidnih normalno hranjenih pacova zapaženo je smanjenje površine β -ćelija. Ovo smanjenje moglo bi se pripisati većem prisustvu funkcionalno nezrelih ćelija, koje se odlikuju manjom površinom upravo zbog neaktivnog sintetskog aparata.

Pod dejstvom saharoze povećava se broj funkcionalno zrelih β -ćelija koje se odlikuju granulama sa izraženim haloom. U isto vreme povećava se broj granula sa uglastim elektron-gustim jezgrom karakterističnim za zrele granule. Dimenzije jezgra zrelih insulinskih granula najveće su upravo u ovoj grupi, što je direktan dokaz o povećanoj sintezi insulina u odgovoru na ishranu obogaćenu saharozom. Pored toga, morfološki dokazi o odigravanju egzocitoze na površini β -ćelija životinja iz ove grupe pokazuju da endokrini pankreas na taj zahtev i odgovara.

Da nakon tretmana ugljenim hidratima dominiraju funkcionalno zrele β -ćelije potvrdili smo i imunohistohemijski detektovanim povećanim prisustvom PDX1 proteina u ovoj grupi, što je u skladu i sa podacima iz literature (Karaca et al. 2009). Prema tome β -ćelije S grupe funkcionalne su i sposobne da sintetišu i sekretuju insulin. Povećanim unosom ugljenih hidrata povećavaju se zahtevi za insulinom, koji se obezbeđuje na račun povećanog kapaciteta biosinteze (Laube et al. 1976) i sekrecije (Del Zotto et al. 1999). Drugi nivo odgovora na povećan unos ugljenih hidrata bio bi hipertrofija/proliferacija β -ćelija, što bi dovelo do povećanja mase β -ćelija (Del Zotto et al. 1999). S obzirom na to da nismo uočili povećanje mase β -ćelija, a što je u skladu sa činjenicom da je adultni pankreas relativno mirujući organ ograničenog rasta, ovaj drugi način da se odgovori na povećane zahteve za insulinom očigledno izostaje. Dakle, pankreas eutireoidnih pacova prehranjivanih saharozom uspeva da odgovori na povećane zahteve za insulinom samo povećanom sintetskom/sekretom aktivnošću.

U MS grupi životinja nisu uočene razlike u izgledu, broju granula, odnosu zrelih i nezrelih granula po jediničnoj površini, kao ni u veličini tamnog jezgra u odnosu na kontrolnu grupu. Dakle, simultano dejstvo metimazola i saharoze približava β -ćelije ove grupe po morfološkim i stereološkim odlikama granula ćelijama kontrolnog pankreasa. Međutim više pozitivnih PDX1 ćelija i nešto veći nivo insulina u serumu MS grupe, uz održanje normoglikemije, može ukazati na početnu blagu insulinsku rezistenciju (Reaven 1988). Ukoliko se prihvati mogućnost da je došlo do povećanja abdominalnih depoa belog masnog tkiva, a na šta upućuju morfološki rezultati ove teze, izostanak statistički značajnog povećanja nivoa insulina u MS grupi mogao bi se objasniti pojavom belih adipocita u pankrasu ovih pacova. Naime, zna se da beli adipociti sekretuju leptin, koji preko receptora na β -ćelijama direktno utiče na smanjenje sekrecije insulina (Kieffer et al. 1996, Poitout et al. 1998), glavnog adipogenog hormona (Kieffer and Habener 2000). Tako, sa povećanjem masnih depoa, viši nivo leptina ispoljava negativno regulatorno delovanje na koncentraciju insulina, da bi se limitiralo dalje akumuliranje lipida u adipocitima (Kieffer and Habener 2000).

Rezultati ove teze koji se tiču funkcije endokrinog pankreasa u produkciji insulina i održavanju homeostaze glukoze potvrđuju da je kontrola nivoa glukoze u cirkulaciji pomoću insulina kompleksan proces koji obuhvata ne samo jednostavno uključivanje i isključivanje produkcije i sekrecije insulina zavisno od količine glukoze u cirkulaciji, nego i učešće niza dodatnih, pre svega humoralnih faktora. Pri tome regulacija aktivnosti insulinskih ćelija ne mora biti primarna funkcija tih faktora, već se njihovi sekundarni efekti ukrštaju sa putevima regulacije funkcije endokrinih β -ćelija, kako je to moguće videti na primeru leptina. Postojanje sistemskog hipotireoidizma već samo po sebi suprimira funkciju β -ćelija, ali u uslovima normalne ishrane, uz moguće uključivanje insulina iz glukagonskih/insulinskih ćelija, ne dovodi do sistemskih poremećaja metabolizma ugljenih hidrata. Situacija se unekoliko menja ukoliko se endokrini pankreas hipotireoidnih životinja optereti povećanim unosom ugljenih hidrata. U tom slučaju potrebno je srazmerno više insulina da bi se održala normoglikemija, što je znak početne faze insulinske rezistencije. Na osnovu toga može se zaključiti da su tireoidni hormoni važni za pravilan tok kaskadnih procesa u odgovoru ciljnih ćelija na insulin. Mesto kritično za ispoljavanje nedostatka tireoidnih

hormona je, moguće, moment internalizacije kompleksa insulin/insulinski receptor u ciljne ćelije.

6. ZAKLJUČCI

- ▶ Tronedeljni tretman metimazolom doveo je do uspostavljanja umerenog sistemskog hipotireoidizma, nezavisno od režima ishrane. Nivoi tireoidnih hormona u cirkulaciji bili su smanjeni, a životinje su zaostajale u rastu.
- ▶ Kod hipotireoidnih životinja, bez obzira na način ishrane, ukupan energetske unos bio je smanjen usled sniženja stope bazalnog metabolizma i smanjenja energetske potreba organizma. Energetske unos eutireoidnih životinja kojima je ponuđen rastvor saharoze bio je znatno iznad kontrolnih vrednosti i to prevashodno na račun ugljenih hidrata, ali se to nije negativno odrazilo na homeostazu glukoze.
- ▶ Manja apsolutna masa pankreasa životinja svih eksperimentalnih grupa posledica je proporcionalnog smanjivanja egzokrine i endokrine komponente pankreasa, koje se kod obe grupe hipotireoidnih životinja dešavalo paralelno sa manjim prirastom životinja. Smanjenje relativne mase pankreasa eutireoidnih životinja prehranjivanih saharozom delom je bilo posledica blagog povećanja telesne mase, a moguće delom i promena na nivou ćelijske degranulacije/egzocitoze.

Egzokrini pankreas

- ▶ Rezultati morfološke analize pokazali su da je sintetska i sekretna aktivnost egzokrinog pankreasa eutireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze bila povišena u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Mehanički efekat zapremine želudačnog i crevnog sadržaja imao je ključnu regulatornu ulogu u ovim procesima.
- ▶ Egzokrini pankreas hipotireoidnih normalno hranjenih životinja bio je u stanju niže aktivnosti, zbog opšteg sniženja metaboličkih procesa i manjeg unosa hrane. U acinusnim ćelijama aktivirani su mehanizmi zimofagije kao zaštite od unutraćelijske aktivacije digestivnih enzima i autodigestije.
- ▶ Acinusne ćelije egzokrinog pankreasa hipotireoidnih životinja koje su unosile rastvor saharoze bile su izložene većem izazovu nego ćelije normalno hranjenih životinja,

kojem su uglavnom uspešno izlaze u susret, uz blage morfo-funkcionalne adaptacije. Pojedinačne ćelije trpele su stres endoplazminog retikuluma i, moguće, podlegle ireverzibilnim oštećenjima.

Endokrini pankreas

- ▶ Primenjeni tretman nije doveo do promene zastupljenosti i distribucije pojedinih tipova endokrinih ćelija u Langerhansovim ostrvcima.
- ▶ Kod normalno hranjenih hipotireoidnih životinja postojao je zastoj u sintezi/sekreciji insulina, manifestovan akumulacijom sitnijih granula u β -ćelijama, koji je donekle kompenzovan sintetskom aktivnošću ćelija koje ko-eksprimiraju insulin i glukagon.
- ▶ β -ćelije životinja koje su unosile rastvor saharoze, bez obzira na tireoidni status, većinom su bile funkcionalne insulin-produkujuće ćelije. Kod eutireoidnih životinja nalazile su se u stanju pune sintetske i sekretne aktivnosti, ali bez naznaka hipertrofije i hiperplazije.
- ▶ U grupi eutireoidnih saharozom prehranjivanih pacova detektovane su i ekstrainsularne β -ćelije u acinusima, koje trenutno nisu bile funkcionalne u sintezi i sekreciji insulina, i koje predstavljaju rezervne insulinske ćelije. Najverovatniji put nastanka ovih ćelija je transdiferencijacijom acinusnih ćelija.
- ▶ Unos rastvora saharoze finu strukturu β -ćelija hipotireoidnih pacova udaljava od grupe tretirane samo metimazolom i približava je kontroli, što se naročito manifestuje ultrastrukturno-stereološkim odlikama granula.
- ▶ Negativan efekat metimazola na sintezu i sekreciju insulina, uz istovremeno povećanje zahteva za ovim hormonom usled unosa saharoze, aktivirao je mehanizme koji produžavaju poluživot insulina. To je dovelo do blagog rasta nivoa ovog hormona u krvi i stvaranja uslova za razvoj insulinske rezistencije.



Na date eksperimentalne uslove pankreas reaguje kao jedinstven organ čije obe komponente, egzokrina i endokrina, sinhronizovano stupaju u adaptivni odgovor. Pri tome, ponaša se i kao stabilan organ u kome se dinamika populacije ćelija ne menja.

U slučaju pojedinačnog delovanja, unos saharoze posredno ili direktno, utiče stimulatивно na aktivnost i egzokrinog i endokrinog pankreasa, dok unos metimazola uspostavljanjem hipotireoidnog stanja tu aktivnost suprimira.

Održanje normoglikemije u hipotireoidizmu i pod povećanim opterećenjem pankreasa saharozom stvara uslove za razvoj insulinske rezistencije, što je simptom koji često prethodi pojavi dijabetesa tipa 2.

7. LITERATURA

Ackermann AM and Gannon M. (2007) Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 38: 193-206.

Adler G and Kern HF. (1975) Regulation of exocrine pancreatic secretory process by insulin in vivo. *Horm Metab Res* 7: 290-296.

Adler G, Rohr G and Kern HF. (1982) Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 27: 993-1002.

Aherne WA and Dunnill MS. (1982a) Methods of counting discrete objects. In: *Morphometry*. (Eds. Aherne WA, Dunnill MS), Edward Arnold, London, pp. 60-74.

Aherne WA and Dunnill MS. (1982b) The estimation of whole organ volume. In: *Morphometry*. (Eds. Aherne WA, Dunnill MS), Edward Arnold, London, pp. 10-18.

Aho HJ, Nevalainen TJ, Havia VT, Heinonen RJ and Aho AJ. (1982) Human acute pancreatitis: a light and electron microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 90: 367-373.

Akhtar A and Gasser SM. (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* 8: 507-517.

Alarcon C, Wicksteed B and Rhodes CJ. (2002) Regulation of the production and secretion of insulin. *Av Diabetol* 18: 168-174.

Alfert M and Geschwind IL. (1958) The development of polysomaty in rat liver. *Exp Cell Res* 15: 230-232.

Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL and Ozcan S. (2008) Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 415: 1-10.

Apte M, Wilson J and Korsten M. (1997) Alcohol related pancreatic damage: mechanisms and treatment. *Alcohol Health and Research World* 21: 13-21.

Arias AE, Boldicke T and Bendayan M. (1993) Absence of trypsinogen autoactivation and immunolocalization of pancreatic trypsin inhibitor in acinar cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 29: 221-227.

Aughsteeen AA and Cope GH. (1987) Changes in the size and number of secretion granules in the rat exocrine pancreas induced by feeding or stimulation in vitro. *Cell Tissue Research* 249: 427-436.

Balk MW, Lang CM, White WJ and Munger BL. (1975) Exocrine pancreatic dysfunction in guinea pigs with diabetes mellitus. *Lab Invest* 32: 28-32.

Banks P. (1997) Acute and chronic pancreatitis. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*, 6th ed, W. B. Saunders Company. Philadelphia, pp. 809-838.

Barrett E. (2003) The thyroid gland. In W.Boron & E.Boulpaep (Eds.), *Medical physiology: A cellular and molecular approach*. Saunders, Philadelphia, pp. 1035-1048.

Baumann O and Walz B. (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205: 149-214.

Beaudoin AR, Grondin G, Filion M and Lord A. (1984) Secretagogues cause a preferential discharge of large size granules in rat pancreas. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 62: 1288-1292.

Ben Abelilil A, Visani AW and Desnuelle P. (1963) Adaptation of the exocrine secretion of rat pancreas to the composition of the diet. *Biochem Biophys Res Commun* 10: 112-116.

Beresford WA. (1990) Direct transdifferentiation: can cells change their phenotype without dividing? *Cell Differ Dev* 29: 81-93.

Blennemann B, Moon YK and Freake HC. (1992) Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. *Endocrinology* 130: 637-643.

Bloom W and Fawcett DW. (1968) Pancreas. In: A textbook of histology. Bloom W, Fawcett DW (eds.), Ninth edition by WB Saunders Co., Philadelphia-London-Toronto, pp. 614-628.

Boelen A. (2009) Thyroid hormones and glucose metabolism: the story begins before birth. *Exp Physiol* 94: 1050-1051.

Bohley P and Seglen PO. (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48: 151-157.

Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT and Smith FE. (1993) A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42: 1715-1720.

Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL and Weir GC. (1989) Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38: 49-53.

Bonner-Weir S. (2000) Perspective: postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141: 1926-1929.

Borgese N, Francolini M and Snapp E. (2006) Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Current Opinion in Cell Biology*, 18: 358-364.

Bourdel G, Girard-Globa A and Forestier M. (1971) Induction of polyploidy in the rat exocrine pancreas by excess dietary methionine. *Lab Invest* 25: 331-336.

Bourdel G. (1983) Effect of separate feeding of proteins and lipids on pancreatic adaptation in the rat. *Am J Physiol* 244: G125-G130.

Brackett KA, Crockett A and Joffe SN. (1983) Ultrastructure of early development of acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 28: 74-84.

Brannon PM. (1990) Adaptation of the exocrine pancreas to diet. *Annu Rev Nutr* 10: 85-105.

Brenta G, Celi FS, Pisarev M, Schnitman M, Sinay I and Arias P. (2009) Acute thyroid hormone withdrawal in athyreotic patients results in a state of insulin resistance. *Thyroid* 19: 665-669.

Brenta G. (2011) Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? *J Thyroid Res* 2011: 1-9.

Brook M and Noel P. (1969) Influence of dietary liquid glucose, sucrose and fructose on body fat formation. *Nature* 22: 562-563.

Burmeister LA, Pachucki J and Germain DL St. (1997) Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* 138: 5231-5237.

Camihort G, Del Zotto H, Gomez Dumm CL and Gagliardino JJ. (2000) Quantitative ultrastructural changes induced by sucrose administration in the pancreatic B cells of normal hamsters. *Biocell* 24: 31-37.

Campbell IL, Hellquist LN and Taylor KW. (1982) Insulin biosynthesis and its regulation. *Clin Sci* 62: 449-455.

Campbell SC and Macfarlane WM. (2002) Regulation of the pdx1 gene promoter in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res* 299: 277-284.

Carpentier JL. (1994) Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia* 37: S117-S124.

Carriere R. (1967) Polyploid cell reproduction in normal adult rat liver. *Exp Cell Res* 46: 533-540.

Case RM. (1978) Secretory process in exocrine pancreas. *Proc Aust Physiol Pharmacol Soc* 9: 29-42.

Cehade J, Kim J, Pinnas JL and Mooradian AD. (1999) Age-related changes in the thyroid hormone effects on malondialdehyde-modified proteins in the rat heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 59-64.

Cheville NF. (2009) Nucleus, ribosomes, the Golgi complex, and secretion. In: Ultrastructural pathology, The comparative cellular basis of disease, second edition, Wiley-Blackwell, pp. 125-151.

Chowdhury P, Nishikawa M, Blevins GW Jr. and Rayford PL. (2000) Response of Rat Exocrine Pancreas to High-Fat and High-Carbohydrate Diets. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 310-315.

Christopher MM. (1997) Hyperlipidemia and other clinicopathologic abnormalities associated with canine hypothyroidism. *Canine Pract* 22: 37-38.

Chung CH and Levine F. (2010) Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. *Rev Diabet Stud* 7: 124-131.

Chung CH, Hao E, Piran R, Keinan E, Levine F. (2010) Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells. *Stem Cells* 28: 1630-1638.

Cnop M, Fougere F and Velloso LA. (2012) Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine* 18: 59-68.

Cooper DS, Kieffer JD, Saxe V, Mover H, Maloof F and Ridgway EC. (1984) Methimazole pharmacology in the rat: studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. *Endocrinology* 114: 786-793.

Cortizo AM, Gomez Dumm CL and Gagliardino JJ. (1985) Effect of thyroid hormone levels upon pancreatic islet function. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 35: 181-191.

Cosen-Binker LI, Binker MG, Wang CC, Hong W and Gaisano HY. (2008) VAMP8 is the v-SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *J Clin Invest* 118: 2535-2551.

Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Muller S, Solovei I and Fakan S. (2006) Chromosome territories-a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18: 307-316.

de Dios I, Garcia-Montero AC, Orfao A and Manso MA. (1999) Selective exocytosis of zymogen granules induces non-parallel secretion in short-term cholecystokinin-stimulated rats. *Journal of Endocrinology* 163: 199-206.

de Dios I, Orfao A, García-Montero AC, Rodriguez AI and Manso MA. (1995) Analysis of isolated zymogen granules from rat pancreas using flow cytometry. *Anal Cell Pathol* 9: 215-228.

Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L and Goldman RD. (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 22: 832-853.

DeFronzo RA, Bonadonna RC and Ferrannini E. (1992) Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368.

Del Zotto H, Gomez Dumm CL, Drago S, Fortino A, Luna GC and Gagliardino JJ. (2002) Mechanisms involved in the β -cell mass increase induced by chronic sucrose feeding to normal rats. *J Endocrinol* 174: 225-231.

Del Zotto H, Massa L, Gomez Dumm CL and Gagliardino JJ. (1999) Changes induced by sucrose administration upon the morphology and function of pancreatic islets in the normal hamster. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 106-112.

Dentice M and Salvatore D. (2011) Local impact of thyroid hormone inactivation. Deiodinases: the balance of thyroid hormone. *J Endocrinol* 209: 273-282.

Di Guglielmo GM, Drake PG, Baass PC, Authier F, Posner BI and Bergeron JJ. (1998) Insulin receptor internalization and signalling. *Mol Cell Biochem* 182: 59-63.

Dimitriadis G, Baker B, Marsh H, Mandarino L, Rizza R, Bergman R, Haymond M and Gerich J. (1985) Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 248: E593-E601.

Dodson G and Steiner D. (1998) The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 8: 189-194.

Dolley DM. (1925) The general morphology of pancreatic cell function in terms of the nucleocytoplasmic relation. *Am J Anat* 35: 153-97.

Dory L, Krause BR and Roheim PS. (1981) Plasma lipids, lipoproteins, and triglyceride turnover in eu- and hypo-thyroid rats and rats on a hypocaloric diet. *Can J Biochem* 59: 715-721.

El-Bakary NA and Mousa AM. (2008) Effect of simvastatin on the exocrine part of the pancreas in adult albino rat and the possible protective role of coenzyme Q10: a light and electron microscopic study. *Egypt J Histol* 31: 312-320.

Elgee NJ and Williams RH. (1955) Effects of thyroid function on insulin-I131 degradation. *Am J Physiol* 180: 13-15.

Emmelot P and Benedetti EL. (1960) Changes in the fine structure of rat liver cells brought about by dimethylnitrosamine. *J Biophys Biochem Cytol* 7: 393-396.

Epstein CJ and Gatens EA. (1967) Nuclear ploidy in mammalian parenchymal liver cells. *Nature* 214: 1050-1051.

Ermak TH and Rothman SS. (1981) Zymogen granules of the pancreas decrease in size in response to feeding. *Cell Tissue Research* 214: 51-66.

Eskelinen EL, Tanaka Y and Saftig P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-145.

Fagerholm S, Ortegren U, Karlsson M, Ruishalme I and Stralfors P. (2009) Rapid insulin-dependent endocytosis of the insulin receptor by caveolae in primary adipocytes. *PLoS ONE* 4: e5985. doi:10.1371/journal.pone.0005985

Fan JY, Carpentier JL, Gorden P, Van Obberghen E, Blackett NM, Grunfeld C and Orci L. (1982) Receptor-mediated endocytosis of insulin: Role of microvilli, coated pits, and coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7788-7791.

Fawcett DW. (1961) Membranes of Cytoplasm. *Lab Invest* 10: 1162-1188.

Fawcett DW. (1994) Pancreas. In: Bloom and Fawcett. A textbook of histology. 12th ed, Chapman & Hall, New York, pp. 689-703.

Finegood DT, Scaglia L and Bonner-Weir S. (1995) Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44: 249-256.

Finegood DT, Tzur D, Fieldus WE, McArthur MD, Dhatt D and Dunichand-Hoedel A. (1997) β -cell mass dynamics during glucose infusion. *Diabetologia* 40 (Suppl. 1): A120.

Fischman DA. (1979) Multinucleation: Comparative aspects and functional implications. In Mauro A, ed. *Muscle regeneration*. New York: Raven Press, pp. 9-12.

Friess H, Buchler MW, Mueller C and Malfertheiner P. (1998) Immunopathogenesis of chronic pancreatitis (Editorial). *Gastroenterology* 115: 1018-1022.

Gaisano HY, Lutz MP, Leser J, Sheu L, Lynch G, Tang L, Tamori Y, Trimble WS and Salapatek AMF. (2001) Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J Clin Invest* 108: 1597-1611.

Gan SI, Edwards AL, Symonds CJ and Beck PL. (2006) Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis: a case-based review. *World J Gastroenterol* 12: 7197-7202.

Geiger D, Carpentier JL, Gorden P, Orci L. (1989) Down-regulation of insulin receptors is related to insulin internalization. *Exp Cell Res* 185: 33-40.

Gomez Dumm CL, Cortizo AM and Gagliardino JJ. (1985) Morphological and functional changes in several endocrine glands induced by hypothyroidism in the rat. *Acta Anat (Basel)* 124: 81-87.

Gomez Dumm CL, Semino MC and Gagliardino JJ. (1989) Quantitative morphological changes in endocrine pancreas of rats with spontaneous diabetes mellitus. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 57: 375-381.

Goodison S, Kenna S and Ashcroft SJ. (1992) Control of insulin gene expression by glucose. *Biochem J* 285: 563-568.

Gorelick FS and Thrower E. (2009) The acinar cell and early pancreatitis responses. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7: S10-S14.

Gray GM. (1971). Intestinal digestion and maldigestion of dietary carbohydrate. *Annual Review of Medicine* 22: 391-404.

Guest PC, Rhodes CJ and Hutton JC. (1989) Regulation of the biosynthesis of insulin-secretory-granule proteins. Co-ordinate translational control is exerted on some, but not all, granule matrix constituents. *Biochem J* 257: 431-437.

Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, and Desdouets C. (2003) Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 278: 19095-19101.

Gundersen HJ and Jensen EB. (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147: 229-263.

Guyton AC and Hall JE. (2006a) Gastrointestinal physiology: secretory functions of the alimentary tract. In: *Textbook of medical physiology*. Saunders; 11th edition pp. 791-807.

Guyton AC and Hall JE. (2006b). Endocrinology and reproduction: insulin, glucagon and diabetes mellitus. In: *Textbook of Medical Physiology*. Saunders; 11th edition pp. 961-977.

Guyton AC and Hall JE. (2006c) Gastrointestinal physiology: digestion and absorption in the gastrointestinal tract. In: *Textbook of Medical Physiology*. Saunders; 11th edition pp. 808-818.

Guyton AC and Hall JE. (2006d) Metabolism and temperature regulation: dietary balances; regulation of feeding; obesity and starvation; vitamins and minerals: metabolism of carbohydrates and formation of ATP. In: *Textbook of Medical Physiology*. Saunders; 11th edition pp. 829-839.

Guyton AC and Hall JE. (2006e). Endocrinology and reproduction: thyroid metabolic hormones. In: Textbook of Medical Physiology. Saunders; 11th edition pp. 931-943.

Handisurya A, Pacini G, Tura A, Gessl A, Kautzky-Willer A (2008) Effects of T4 replacement therapy on glucose metabolism in subjects with subclinical (SH) and overt hypothyroidism (OH). *Clin Endocrinol (Oxf)* 69: 963-969.

Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD and Ron D. (2001) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7: 1153-63.

Hashimoto A, Kita I, Okada K and Fujimoto Y. (1979) Juvenile acinar atrophy of the pancreas of a dog. *Vet Pathol* 16: 74-80.

Heath DF, Frayn KN and Rose JG. (1977) Rates of glucose utilization and glucogenesis in rats in the basal state induced by halothane anaesthesia. *Biochem J* 162: 643-651.

Helin H, Mero M, Markkula H and Helin M. (1980) Pancreatic acinar ultrastructure in human acute pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 387: 259-270.

Hinke SA, Hellemans K and Schuit FC. (2004) Plasticity of the β cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic β cell for the next meal. *J Physiol* 558: 369-380.

Howard F and Yudkin I. (1963) Effect of dietary change upon the amylase and trypsin activities of the rat pancreas. *Br J Nutr* 100: 281-294.

Iovanna J and Vaccaro MI. (2010) Quantitation of autophagy in the pancreas at the tissue and cell levels. *The Pancreapedia*, Version 1.0, pp. 1-12. doi: 10.3998/panc.2010.13

Ishidoh K and Kominami E. (2002) Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem* 383: 1827-1831.

Johnson A, Hurwitz R and Kretchmer N. (1977) Adaptation of rat pancreatic amylase and chymotrypsinogen to changes in diet. *J Nutr* 107: 87-96.

Jordan SW. (1964) Electron microscopy of hepatic regeneration. *Experimental and Molecular Pathology* 3: 183-200.

Kahn BB and Flier JS. (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481.

Kakinuma C, Abe H and Suda K. (2007) Experimental animal models of pancreatic fibrosis, Suda K (ed): *Pancreas - Pathological practice and research*. Basel, Karger, pp. 105-134.

Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N and Matsuhisa M. (2009) Combination of MafA, PDX-1 and NeuroD is a useful tool to efficiently induce insulin-producing surrogate beta-cells. *Curr Med Chem* 16: 3144-3151.

Karaca M, Castel J, Tourrel-Cuzin C, Brun M, Geant A, Dubois M, Catesson S, Rodriguez M, Luquet S, Cattan P, Lockhart B, Lang J, Ktorza A, Magnan C and Kargar C. (2009) Exploring functional beta-cell heterogeneity in vivo using PSA-NCAM as a specific marker. *PLoS One* 4: 5555. doi:10.1371/journal.pone.0005555

Karaca M. (2010) In vivo functional heterogeneity among β -cells. *Islets* 2: 124-126.

Karam JH, Grodsky GM, Ching K-N, Schmid F, Burrill K and Forsham PH. (1974) "Staircase" glucose stimulation of insulin secretion in obesity: measure of beta-cell sensitivity and capacity. *Diabetes* 23: 763-770.

Katsilambros N, Ziegler R, Schatz H, Hinz M, Maier V and Pfeiffer EF. (1972) Intravenous glucose tolerance and insulin secretion in the rat after thyroidectomy. *Horm Metab Res* 4: 377-379.

Kaufmann RJ. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110: 1389-1398.

Kieffer TJ and Habener JF. (2000) The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E1-E14.

Kieffer TJ, Heller RS and Habener JF. (1996) Leptin receptors expressed on pancreatic β -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224: 522-527.

Kloppel G, Dreyer T, Willemer S, Kern HF and Adler G. (1986) Human acute pancreatitis: Its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 409: 791-803.

Knoch KP, Bergert H, Borgonovo B, Saeger HD, Altkruger A, Verkade P and Solimena M. (2004) Polypyrimidine tract-binding protein promotes insulin secretory granule biogenesis. *Nature Cell Biol* 6: 207-214.

Kohrle J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* 57: 1853-1863.

Koike H, Steer ML and Meldolesi J. (1982) Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. *Am J Physiol* 242: G297-G307.

Koko V, Laban A, Radovanovic J, Ristic V and Ristic M. (1988) Effect of long-term sucrose ingestion on the rat endocrine pancreas. Morphometric study. *Arch Bio Sci* 40: 13-23.

Kumar V, Abbas AK and Fausto N. (2005a) The pancreas. In: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Saunders; 7th edition, pp. 939-953.

Kumar V, Abbas AK and Fausto N. (2005b) The endocrine system. In: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Saunders; 7th edition, pp. 1155-1226.

Kuroda J, Suda K and Hosokawa Y. (1998) Periacinar collagenization in patients with chronic alcoholism. *Pathology International* 48: 857-868.

Kuroda J, Suda K and Hosokawa Y. (2007) Electron-microscopic aspect of pancreatic fibrosis: pancreatic periacinar collagenization at the initial stage. Suda K (ed): *Pancreas - Pathological practice and research*. Basel, Karger, pp. 80-93.

- Laube H, Schatz H, Nierle C, Fussgänger R and Pfeiffer EF. (1976) Insulin secretion and biosynthesis in sucrose fed rats. *Diabetologia* 12: 441-446.
- Le Drean G, Le Huerou-Luron I, Gestin M, Desbois C, Rome V, Bernard C, Dufresne M, Moroder L, Gully D, Chayvialle JA, Fourmy D and Guilloteau P. (1999) Exogenous CCK and gastrin stimulate pancreatic exocrine secretion via CCK-A but also via CCK-B/gastrin receptors in the calf. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 438: 86-93.
- Leahy JL. (1990) Natural history of b-cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care* 13: 992-1010.
- Ledda-Columbano GM, Perra A, Pibiri M, Molotzu F and Columbano A. (2005) Induction of acinar cell proliferation by thyroid hormone. *J Endocrinol* 185: 393-399.
- Leduque P, Wolf B, Aratan-Spire S, Dubois PM and Czernichow P. (1985) Immunocytochemical location of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the B-cells of adult hypothyroid rat pancreas. *Regul Pept* 10: 281-292.
- Lee JT, Lebenthal E and Lee PC. (1989) Rat pancreatic nuclear thyroid hormone receptor: characterization and postnatal development. *Gastroenterology* 96: 1151-1157.
- LeGrow AB, Fielding DC and Pressley TA. (1999) Stimulation of Na,K-ATPase by hypothyroidism in the thyroid gland. *Journal of Endocrinology* 160: 453-460.
- Lenzen S and Bailey CJ. (1984) Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. *Endocr Rev* 5: 411-421.
- Levine B and Kroemer G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27-42.
- Lin BJ, Nagy BR and Haist RE. (1972) Effect of various concentrations of glucose on insulin biosynthesis. *Endocrinology* 91: 309-311.
- Lin Y and Sun Z. (2011) Thyroid hormone potentiates insulin signaling and attenuates hyperglycemia and insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes. *Br J Pharmacol* 162: 597-610.

Ling Z and Pipeleers DG. (1996) Prolonged exposure of human beta cells to elevated glucose levels results in sustained cellular activation leading to a loss of glucose regulation. *J Clin Invest* 98: 2805-2812.

Ling Z, Kiekens R, Mahler T, Schuit FC, Pipeleers-Marichal M, Abdullah S, Gunther K, Malaisse WL and Pipeleers DG. (1996) Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta cells. *Diabetes* 45: 1774-1782.

Lipsett M and Finegood DT. (2002) β -cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 51: 1834 -1841.

Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ and Gomez Dumm CL. (1996) Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 45: 1527-1532.

Lu RB, Chaichanwatanakul K, Lin CH, Lebenthal E and Lee PC. (1988) Thyroxine effect on exocrine pancreatic development in rats. *Am J Physiol* 254: G315-321.

Macdonald I and Roberts JB. (1965) The incorporation of various C14 dietary carbohydrates into serum and liver lipids. *Metabolism* 14: 991-999.

Mareninova OA, Hermann K, French SW, O'Konski MS, Pandol SJ, Webster P, Erickson AH, Katunuma N, Gorelick FS, Gukovsky I and Gukovskaya AS. (2009) Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis *J Clin Invest* 119: 3340-3355.

Marshall MW, Womack M, Hildebrand H and Munson AW. (1968) Effects of types and level of carbohydrates and protein on carcass composition of adult rats. *Proc Soc exp Biol (NY)* 132: 227-232.

Marshall S. (1985) Dual pathways for the intracellular processing of insulin. Relationship between retroendocytosis of intact hormone and the recycling of insulin receptors. *J Biol Chem* 260: 13524-13531.

McClain DA and Olefsky JM. (1988) Evidence for two independent pathways of insulin-receptor internalization in hepatocytes and hepatoma cells. *Diabetes* 37: 806-815.

Melkman-Zehavi T, Oren R, Kredon-Russo S, Shapira T, Mandelbaum AD, Rivkin N, Nir T, Lennox KA, Behlke MA, Dor Y and Hornstein E. (2011) miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via downregulation of transcriptional repressors. *The EMBO Journal* 30: 835-845.

Melloul D. (2004) Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in β -cell function. *Ann N Y Acad Sci* 1014: 28-37.

Melmed RN, Benitez CJ and Holt SJ. (1973) An ultrastructural study of the pancreatic acinar cell in mitosis, with special reference to changes in the Golgi complex. *J Cell Sci* 12: 163-173.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM and Klionsky DJ. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451: 1069-1075.

Montanya E, Nacher V, Biarnes M and Soler J. (2000) Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49: 1341-1346.

Morgan RG, Schaeffer BK and Longnecker DS. (1986) Size and number of nuclei differ in normal and neoplastic acinar cells from rat pancreas. *Pancreas* 1: 37-43.

Movassat J, Saulnier C, Serradas P and Portha B. (1997) Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 40: 916-925.

Nagata T and Ma H. (2004) Electron microscopic radioautographic study on protein synthesis in amitotic hepatocytes of the aging mouse. *Medical electron microscopy* 37: 62-69.

Niederau C and Grendell JH. (1988) Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment. *J Clin Invest* 81: 229-236.

Ogata K, Miyata K, Kushida M, Ozaki K, Sukata T, Uwagawa S, Okuno Y and Kawamura S. (2011) Histopathological features of postmortem changes and artifacts in rat pancreas. Abstracts from The 27th Annual Meeting of The Japanese Society of Toxicologic Pathology Osaka, January 27-28, P-111.

Olefsky JM, Marshall S, Berhanu P, Saekow M, Heidenreich K and Green A. (1982) Internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors in adipocytes. *Metabolism* 31: 670-690.

Pap A. (2004) Effects of insulin and glucose metabolism on pancreatic exocrine function. *Int J Diabetes & Metabolism* 12: 30-34.

Pavelka M and Roth J. (2005a) Acinar centre: acinar and centroacinar cells. In: *Functional ultrastructure: atlas of tissue biology and pathology*, Springer Wien New York, p. 178.

Pavelka M and Roth J. (2005b) Rough endoplasmic reticulum: storage site of aggregates of misfolded glycoproteins. In: *Functional ultrastructure: atlas of tissue biology and pathology*, Springer Wien New York, p. 34.

Pavelka M and Roth J. (2005c) Secretory granules. In: *Functional ultrastructure: atlas of tissue biology and pathology*, Springer Wien New York, p. 78.

Pavelka M and Roth J. (2005d) Endocrine secretion: insulin-producing beta cells of islets of Langerhans. In: *Functional ultrastructure: atlas of tissue biology and pathology*, Springer Wien New York, p. 188.

Permutt M A and Kipnis DM. (1972) Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation. *J Biol Chem* 247: 1194-1199.

Petrovic N, Cvijic G and Davidovic V. (2001) The activity of antioxidant enzymes and the content of uncoupling protein-1 in the brown adipose tissue of hypothyroid rats: comparison with effects of iopanoic acid. *Physiol Res* 50: 289-297.

- Pfister K, Rossi GL, Freudiger U and Bigler B. (1980) Morphological studies in dogs with chronic pancreatic insufficiency. *Virchows Arch A Path Anat and Histol* 386: 91-105.
- Pipeleers D, Kiekens R, Ling Z, Wilikens A and Schuit F. (1994). Physiologic relevance of heterogeneity in the pancreatic beta-cell population. *Diabetologia* 37: S57-S64.
- Pipeleers D. (1992) Heterogeneity in pancreatic b-cell population. *Diabetes* 41: 777-781.
- Poitout V, Rouault C, Guerre-Millo M, Briaud I and Reach G. (1998) Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans. *Endocrinology* 139: 822-826.
- Prentki M, Tornheim K and Corkey BE. (1997) Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40: S32-41.
- Raeder M and Mathisen O. (1982) Effect of intravenous infusion of hypertonic glucose solutions on pancreatic HCO₃(-) secretion. *Acta Physiol Scand* 115: 349-354.
- Ramos S, Goya L, Alvarez C and Pascual-Leone AM. (1998) Mechanism of hypothyroidism action on insulin-like growth factor-I and -II from neonatal to adult rats: insulin mediates thyroid hormone effects in the neonatal period. *Endocrinology* 139: 4782-4792.
- Ramos S, Goya L, Alvarez C, Martin MA and Pascual-Leone AM. (2001) Effect of thyroxine administration on the IGF/IGF binding protein system in neonatal and adult thyroidectomized rats. *J Endocrinol* 169: 111-122.
- Ravid K, Lu J, Zimmet JM and Jones MR. (2002) Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 190: 7-20.
- Reaven GM. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.

Rhodes CJ. (2000) Processing of the insulin molecule. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. *Diabetes Mellitus. A Fundamental and Clinical Text*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 20-38.

Rinderknecht H. (1993) Pancreatic secretory enzymes. In: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease* (2nd ed.), edited by Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, and Scheele GA. New York: Raven, pp. 219-251.

Robertson RP, Olson LK and Zhang HJ. (1994) Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes* 43: 1085-1089.

Robertson RP. (1989) Type II diabetes, glucose “non-sense,” and islet desensitization. *Diabetes* 38: 1501-1505.

Ron D and Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.

Rosenberg L. (1995) In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplantation* 4: 371-383.

Rosenqvist U, Mahler R and Carlson LA. (1981) Lipid transport in the hypothyroid rat as reflected by the serum concentrations of free fatty acids, lipoproteins, lecithin-cholesterol acyltransferase and lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *J Endocrinol Invest* 4: 75-80.

Ross MH, Kaye GI and Pawlina W. (2003) *Pancreas* In: *Histology: a text and atlas*, Fourth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 551-559.

Rutkowski DT and Hegde RS. (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 189: 783-794.

Sabb IE, Godfrey PM and Brannon PM. (1986) Adaptive response of rat pancreatic lipase to dietary fat: effects of amount and type of fat. *J Nutr* 116: 892-899.

Saito A, Williams JA and 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.

Saltiel AR and Kahn CR. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865): 799-806.

Saltiel AR. (2000) Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardio-vascular diseases. *J Clin Invest* 106: 163-164.

Sans MD and Williams JA. (2002) Translational control of protein synthesis in pancreatic acinar cells. *Int J Gastrointest Cancer* 31: 107-115.

Scemama JL, Fourmy D, Zahidi A, Pradayrol L, Susini C and Ribet A. (1987) Characterisation of gastrin receptors on a rat pancreatic acinar cell line (AR42J). A possible model for studying gastrin mediated cell growth and proliferation. *Gut* 28: 233-236.

Schaeffer M, Hodson DJ, Lafont C and Mollard P. (2011) Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. *J Mol Endocrinol* 47: R59-66.

Scheele GA. (1993) Regulation of pancreatic gene expression in response to hormones and nutritional substrates. In: *The Pancreas. Biology, pathobiology and disease* (2nd ed.), edited by Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, and Scheele GA. New York: Raven, pp. 103-120.

Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S and Kaufman RJ. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7: 1165-1176.

Schick I, Verspohl R, Kern H and Scheele G. (1984) Two distinct adaptive responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. *Am J Physiol* 247: G611-G616.

Schroder M and Kaufman RJ. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63.

Schuit FC, In't Veld PA and Pipeleers DG. (1988) Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3865-3869.

Schuit FC, Kiekens R and Pipeleers DG. (1991) Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 1182-1187.

Shulman GI. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176.

Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard DR, Jr, Reid LM and Gupta S. (1999) Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 276 (Gastrointest. Liver Physiol. 39): G1260-G1272.

Smith RM and Jarett L. (1988) Receptor-mediated endocytosis and intracellular processing of insulin: ultrastructural and biochemical evidence for cell-specific heterogeneity and distinction from nonhormonal ligands. *Lab Invest* 58: 613-629.

Snapp EL. (2004) Endoplasmic reticulum biogenesis: proliferation and differentiation. In: *The biogenesis of cellular organelles. Molecular biology intelligence unit*. Edited by Mullins C: C. Landes Bioscience, Georgetown TX and Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 63-95.

Snook JT. (1971) Dietary regulation of pancreatic enzymes in the rat with emphasis on carbohydrate. *Am J Physiol* 221: 383-387.

Sorkin A and von Zastrow M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3: 600-614.

Taguchi M, Yokota M, Koyano H, Endo Y and Ozawa Y. (1999) Acute pancreatitis and parotitis induced by methimazole in a patient with Graves' disease. *Clin Endocrinol* 51: 667-670.

- Takano S, Kimura T, Kawabuchi M, Yamaguchi H, Kinjo M and Nawata H. (1994) Ultrastructural study of the effects of stress on the pancreas in rats. *Pancreas* 9: 249-257.
- Tapley DF. (1964) Mode and site of action of thyroxine. *Mayo Clin Proc* 39: 626-636.
- Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pederson S and Hedman R. (1963) The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J* 86: 408-428.
- Vaccaro MI. (2012) Zymophagy: selective autophagy of secretory granules. *International Journal of Cell Biology* 2012: 396705. doi:10.1155/2012/396705
- Van Schravendijk CF, Kiekens R and Pipeleers DG. (1992) Pancreatic beta cell heterogeneity in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 267: 21344-21348.
- Venditti P, De Rosa R and Di Meo S. (2003) Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. *Free Radic Biol Med* 35: 485-494.
- Visser WE, Friesema EC, Jansen J and Visser TJ. (2008) Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab* 19: 50-56.
- Walkowiak J, Wadolowska L, Szaflarska-Poplawska A, Lisowska A, Bugajewska A and Przyslawski J. (2007) The elimination of meat from the diet selectively decreases pancreatic elastase secretion. *British Journal of Nutrition* 98: 154-158.
- Webster M, Witkin KL and Cohen-Fix O. (2009) Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *Journal of Cell Science* 122: 1477-1486.
- Weibel ER. (1979) *Stereological Methods, Vol. 1: Practical methods for biological morphometry*. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco, Academic Press.
- Weir GC and Leahy JL. (1994) Pathogenesis of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. In *Joslin's Diabetes mellitus, 13th*. C.R. Hahn and G.C. Weir, editors. Lea & Febiger, Malvern, PA. pp. 240-264.

Wiberg ME, Saari SAM and Westermarck E. (1999) Exocrine pancreatic atrophy in german shepherd dogs and rough-coated collies: an end result of lymphocytic pancreatitis. *Vet Pathol* 36: 530-541.

Wicker C and Puigserver A. (1987) Effects of inverse changes in dietary lipid and carbohydrate on the synthesis of some pancreatic secretory proteins. *Eur J Biochem* 162: 25-30.

Wilhelmsen K, Ketema M, Truong H and Sonnenberg A. (2006) KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes. *J Cell Sci* 119: 5021-5029.

Williams JA. (2006) Regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterol* 22: 498-504.

Wu P. (2000) Thyroid disease and diabetes. *Clin Diabetes* 18: 38-39.

Xie Z and Klionsky DJ. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102-1109.

Yip CC and Ottensmeyer P. (2003) Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem* 278: 27329-27332.

Yki-Jarvinen H. (1992) Glucose toxicity. *Endocr Rev* 13: 415-431.

Yonetci N, Oruc N, Ozutemiz AO, Kumanlioglu K, Yuce G and Batur Y. (2002) Effects of methimazole pretreatment on cerulein induced acute pancreatitis in rats. *Exp Toxic Pathol* 54: 197-201.

Zhang W, Olafsson AS, Lancaster C et al. (1992a) Effects of propylthiouracil on cerulein induced acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 102: 301.

Zhang W, Olafsson AS, Lancaster C et al. (1992b) Permissive role of thyroid hormone in acute pancreatitis induced by cerulein in rats. *Gastroenterology* 102: 300.

Zhao L and Ackerman SL. (2006) Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 444-452.

Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J and Melton DA. (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-632.

Biografija autora

Mirela Ukropina (rođ. Vereš) rođena je 1975. godine u Beogradu, SFRJ. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, završila je 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,13. Magistarske studije upisuje 2002. godine na istom fakultetu, smer Citologija. Magistarsku tezu „Citološke promene retroperitonealnog i gonadalnog belog masnog tkiva pacova u hiper- i hipotireoidizmu“ odbranila je 2004. godine čime je stekla diplomu magistra bioloških nauka.

Od 2002. godine zaposlena je na Biološkom fakultetu kao asistent-pripravnik, a od 2005. u zvanju asistenta, gde učestvuje u izvođenju i unapređivanju praktične nastave niza predmeta iz oblasti biologije ćelija i tkiva. Koautor je tri praktikuma za predmete na kojima je angažovana u nastavi. Bila je član komisije za odbranu 10 diplomskih radova na Biološkom fakultetu.

Gostovala je u IS Petnica kao predavač učenicima srednjoškolskog uzrasta.

Publikovala je šest radova u časopisima međunarodnog značaja, ima jedno saopštenje na kongresu domaćeg značaja i 13 kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Bila je učesnik dva nacionalna projekta. Član je Srpskog i Evropskog društva za mikroskopiju.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора мр Мирела Укропина
Број индекса /
Студијски програм /
Наслов рада „Утицај исхране обogaћене угљеним хидратима на
морфолошке и ултраструктурне одлике панкреаса
пацова у условима експериментално индукованог
хипотиреозидизма“
Ментор др Маја Чакић Милошевић

Потписани/а М. Чакић Милошевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 25.05. 2012.

М. Укропина

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утицај исхране обогаћене угљеним хидратима на морфолошке и ултраструктурне одлике панкреаса пацова у условима експериментално индукованог хипотиреоидизма“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25. 05. 2012.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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 прераде. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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 прераде. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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.